

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE A STABILIZACE PANKREATINU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

AGÁTA WURSTOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE A STABILIZACE PANKREATINU

CHARACTERIZATION AND STABILIZATION OF PANCREATIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

AGÁTA WURSTOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0662/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Agáta Wurstová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název bakalářské práce:

Charakterizace a stabilizace pankreatinu

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - charakterizace pankreatinu a jeho složek, fyziologické a biochemické účinky.
2. Optimalizace metod stanovení koncentrace a aktivity enzymových složek pankreatinu.
3. Testování možnosti enkapsulace pankreatinu do PHA částic.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Agáta Wurstová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Práce se zaměřuje na studium enzymatické směsi pankreatinu, její charakterizaci a následnou enkapsulaci do liposomů. Jako srovnávací proteiny byly použity hovězí sérový albumin a trypsin. Charakterizace pankreatinu se skládá ze dvou částí. V první části je práce zaměřena na optimalizaci metod stanovení koncentrace pomocí absorpční spektrofotometrie s využitím základních metod pro identifikaci proteinů (Biuretová metoda, Hartree-Lowryho metoda a Bradfordova metoda). Dále bylo proměřeno absorpční spektrum daného proteinu v UV oblasti. Jako metoda identifikace proteinu a zjištění jeho relativní molekulové hmotnosti byla použita metoda SDS-PAGE. Pro identifikaci složek pankreatinu byla použita LPLC ve dvou modifikacích, iontoměničová chromatografie a gelová filtrace. Druhá část práce je věnovaná charakteristice pankreatinu jako enzymu, primárně zjištění optimálních hodnot pH a teploty pro nejdůležitější enzymatické aktivity pankreatinu – proteolytickou (pH 8,9 a 50°C), amylázovou (pH 7 a 40 °C) a lipolytickou (pH 7 a 50 °C). Poslední část práce zaujímá enkapsulace pankreatinu do liposomů a pomocí přístroje DLS také stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciálu. Částice samovolně neuvolňovaly enkapsulované enzymy, k jejich uvolnění došlo až po aplikaci fosfolipázy D, čímž bylo potvrzeno, že liposomy mohou být použity jako transportní systémy pro nativní enzymy.

Klíčová slova:

Pankreatin, hovězí sérový albumin, trypsin, SDS-PAGE, enzymová aktivita, LPLC, DLS, liposomy, enkapsulace

ABSTRACT

This work focuses on a study of enzyme mixture pancreatin, its characterization and subsequent encapsulation into liposomes. As a reference proteins bovine serum albumin and trypsin were used. Characterization of pancreatin consisted of two parts. The first part focuses on optimization of methods for the concentration determination by absorption spectrophotometry using basic methods for identifying proteins (Biuret method, Hartree-Lowry method and Bradford method). Moreover, UV spectrums of the protein were measured. As a method for identification of protein's molecular weight, SDS-PAGE was used. To identify components of pancreatin, LPLC was employed in two modifications, ion-exchange chromatography and size exclusion chromatography. The second part is dedicated to the characterization of pancreatin as enzyme in terms of pH and temperature optimum for the enzyme activities of protease (pH 9, 8 and 50 °C), amylase (pH 7 and 40 °C) and lipase (pH 7 and 50 °C). The last part of this work aimed at an encapsulation of pancreatin into liposomes and DLS analysis of distribution of particles and their zeta potential. Liposomes did not spontaneously release encapsulated enzyme. To confirm that proteins were successfully entrapped into liposomes, their structure was disrupted by application of phospholipase D. In conclusion, liposomes can be utilized as delivery systems for native enzymes.

Keywords:

Pancreatin, bovine serum albumin, trypsin, SDS-PAGE, enzyme activity, LPLC, DLS, liposomes, encapsulation

WURSTOVÁ, A. *Charakterizace a stabilizace pankreatinu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 62 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za pomoc v laboratoři a cenné rady, a také paní doc. RNDr. Ivaně Márové Csc. za inspiraci a přívětivý přístup.

Obsah

Obsah.....	9
1 Úvod.....	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Obecná charakteristika enzymů.....	12
2.1.1 Klasifikace enzymů.....	12
2.1.2 Struktura molekul enzymů.....	12
2.1.3 Substrátová specifita.....	14
2.1.4 Katalytická účinnost.....	15
2.2 Pankreatin.....	15
2.2.2 Příprava.....	15
2.2.3 Využití.....	16
2.3 Elektroforéza.....	16
2.3.1 LPLC.....	18
2.4 Liposomy.....	20
2.5 DLS metoda stanovování distribuce velikosti částic a zeta potenciálu.....	22
2.5.1 DLS.....	22
2.5.2 Zeta potenciál.....	22
3 Cíl práce.....	24
4 Experimentální část.....	25
4.1 Použité chemikálie a přístroje.....	25
4.1.1 Chemikálie.....	25
4.1.2 Přístroje.....	25
4.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	25
4.2.1 Biuretová metoda.....	25
4.2.2 Hartree-Lowryho metoda.....	25
4.2.3 Bradfordova metoda.....	26
4.3 Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti.....	26
4.4 Stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy.....	26
4.5 Stanovení pH optima vybraných pankreatických enzymů.....	27
4.5.1 pH optimum proteázové aktivity pankreatinu.....	27
4.5.2 pH optimum amylázové aktivity pankreatinu.....	28
4.5.3 pH optimum lipázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6 Stanovení teplotní aktivity pankreatinu.....	29
4.6.1 Teplotní optimum proteázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6.2 Teplotní optimum amylázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6.3 Teplotní optimum lipázové aktivity pankreatinu.....	30
4.7 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC.....	30
4.7.1 Iontoměničová LPLC.....	30
4.7.2 Gelová LPLC.....	30
4.8 Enkapsulace pankreatinu do lipozomů pomocí ultrazvuku.....	30
4.8.1 Stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu.....	31
4.8.2 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí.....	31
4.9 Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu.....	31
5 Výsledky.....	32

5.1	Výsledky stanovení koncentrace proteinů.....	32
5.1.1	Biuretová metoda	32
5.1.2	Hartree – Lowryho metoda	33
5.1.3	Bradfordova metoda	35
5.2	Absorpční spektra vybraných proteinů.....	37
5.3	Výsledky stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy.....	38
5.4	Výsledky stanovení enzymových aktivit pankreatinu v různém pH.....	39
5.4.1	Proteázová aktivita pankreatinu.....	39
5.4.2	Amylázová aktivita pankreatinu	40
5.4.3	Lipázová aktivita pankreatinu	42
5.5	Stanovení teplotního optima jednotlivých enzymů pankreatinu	44
5.5.1	Proteázová aktivita pankreatinu.....	44
5.5.2	Amylázová aktivita pankreatinu	45
5.5.3	Lipázová aktivita pankreatinu	46
5.6	Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC	48
5.6.1	Iontoměničová LPLC	48
5.6.2	Gelová filtrace LPLC.....	48
5.7	Enkapsulace do liposomů.....	49
5.7.1	Výsledky stanovení množství enkapsulovaného pankreatinu	50
5.7.2	Výsledky stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu	50
5.7.3	Výsledky stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciál	51
6	Závěr	58
7	Seznam použitých zkratk	60
8	Literatura	61

1 Úvod

Enzymy jsou látky potřebné pro všechny chemické reakce uskutečňující se ve všech živých systémech. Jedna z nejdůležitějších funkcí enzymů v těle je účast při trávení potravy. K tomuto účelu slouží slinivka břišní, tedy orgán trávicí soustavy určen pro produkci pankreatické šťávy obsahující enzymy, které se souhrnně nazývají pankreatin. Jelikož pankreatická šťáva musí umět štěpit bílkoviny, cukry i tuky, jsou v pankreatinu zastoupeny všechny různé enzymy s odlišnými vlastnostmi pro hydrolýzu potravy jakéhokoli charakteru. Jejich přítomnost byla ověřena pomocí SDS-PAGE. V rámci práce byla vyzkoušena enkapsulace pankreatinu do liposomů a byla studována jejich stabilita, možnost transportu enkapsulovaných enzymů, jejich následného uvolňování a distribuce velikosti částic.

Pro enkapsulaci bylo nutné zjistit optimální podmínky účinnosti enzymů, tedy pH a teplota, při nichž mají enzymy nejvyšší účinnost. Pro stanovení enkapsulační účinnosti byly optimalizovány metody zjištění celkové koncentrace proteinů a na jejich základě byly sestaveny kalibrační křivky.

Enkapsulace do liposomů byla provedena přímou ultrazvukací směsí fosfolipidů a cholesterolu. Liposomy pro enkapsulaci byly vybrány z důvodu jejich jednoduchosti, snadné přípravě a netoxicitě. Připravené částice byly studovány jak z hlediska jejich stability pomocí zeta potenciálu, ale také ve smyslu aktivity enkapsulovaných enzymů, kde byly zkoumány vlivy ultrazvuku na samotný enzym. Také bylo studováno působení enzymu fosfolipázy D na liposomy.

Pankreatin se používá jako lék na různé onemocnění slinivky břišní, jako je pankreatitida, cystická fibróza nebo i rakovina. Kromě toho, pankreatin nalézá využití i v průmyslu, kde pomáhá při čištění různých materiálů od biologicky degradovatelných látek.

2 Teoretická část

2.1 Obecná charakteristika enzymů

Enzymy jsou molekuly s katalytickou funkcí, tzn. urychlují chemické přeměny v organismu aniž by ovlivnily složení rovnovážné směsi. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Jestli urychlují chemické přeměny, nazývají se enzymy, pokud katalyzují proces, při kterém nedochází k chemické změně, ale pouze např. ke změnám konformace sloučeniny, jedná se o faktory [1]. Podle zapojení enzymu v reakci se rozlišují na ty, které využívají vlastní polypeptidový řetězec a na ty, které pro svou funkci potřebují ještě organickou neproteinovou složku tzv. koenzym. Koenzymy často vychází z vitaminů, jejichž příjem je v potravě nezbytný. Funkční spojení enzymu s koenzymem se nazývá holoenzym, nefunkční enzym bez koenzymu je apoenzym [2,3]. Katalytickou funkci může vykonávat jednoduchá nebo složená bílkovina. Nebílkovinnou částí enzymů je tzv. kofaktor, například ionty kovů nebo organická molekula, kdy svým spojením nebo spolupůsobením zesiluje katalytický účinek [1,2,3].

Enzymy se vyskytují ve všech živých systémech a počet různých druhů těchto enzymů se odhaduje až na miliardy. Jejich důležitou vlastností je netoxičita, na druhou stranu ale jsou vysoce citlivé a rychle se opotřebovávají, jsou tedy stále odbourávány a znovu syntetizovány [1].

V porovnání s běžnými katalyzátory se liší v mnoha ohledech, např.: urychlují reakce mnohem více než běžné katalyzátory, působí za mírných reakčních podmínek určeným organismem, mají vyšší specifitu pro určitou reakci s téměř úplným vyloučením tvorby vedlejších produktů a další [3].

2.1.1 Klasifikace enzymů

Enzymy se rozdělují do šesti základních tříd dle funkce v organismu:

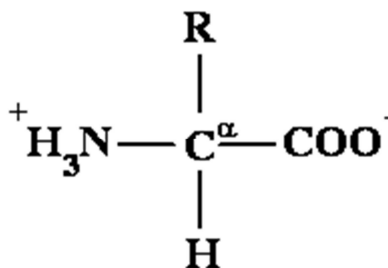
- 1) Oxidoreduktázy – nejpočetnější třída, skládá se pouze ze složených bílkovin, enzymy katalyzují mezimolekulární oxidačně redukční přeměny.
- 2) Transferázy – početná skupina složených bílkovin přenášející skupiny jako např.: $-\text{CH}_3$ a $-\text{NH}_2$ z donoru na akceptor.
- 3) Hydrolázy – početná skupina spíše jednoduchých bílkovin štěpící vazby (jako je peptidová či esterová vazba) hydrolyticky.
- 4) Lyázy – málo početná skupina složených bílkovin katalyzující nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C–C, C–O, C–N.
- 5) Isomerázy – nejméně početná skupina jednoduchých bílkovin realizující intramolekulové přesuny atomů a skupin neboli přeměny izomerů.
- 6) Ligázy – málo početná skupina složených bílkovin katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za rozkladu látky uvolňující energii [1].

2.1.2 Struktura molekul enzymů

2.1.2.1 Aminokyseliny

Všechny známé enzymy jsou bílkovinné povahy [2]. Základní stavební jednotkou bílkovin jsou aminokyseliny, kterých je celkově 20, a jejich různými kombinacemi jsou vytvořeny všechny bílkoviny živých systémů. Tyto základní aminokyseliny se nazývají kódované

aminokyseliny, všechny jsou tzv. typu α , což znamená, že karboxylová i amino skupina je vázána na stejný atom uhlíku [4]. Základní struktura u všech aminokyselin je identická viz. Obr. 1.



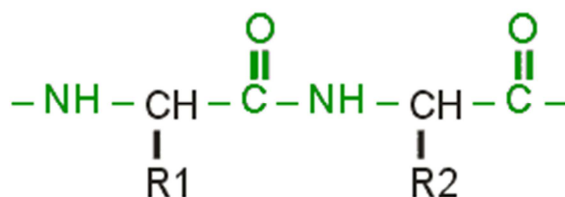
Obr. 1: Základní struktura aminokyselin [23]

Všechny kódované aminokyseliny mají triviální názvy nebo jsou odvozeny z názvu zdroje, z něhož byly izolovány nebo z výrazné vlastnosti. Ke zkrácenému zápisu slouží první tři písmena triviálního názvu. S výjimkou nejjednodušší aminokyseliny, glycinu, obsahují ve své struktuře chirální uhlík C^α , existují tedy ve dvou konfiguracích lišících se pouze v prostorové orientaci. Tyto dvě sloučeniny se pak nazývají enantiomery, značí se L a D konfigurace podle aminoskupiny ležící buďto vpravo (D) nebo vlevo (L). V bílkovinách se vyskytují pouze formy typu L. Aminokyseliny se dále dělí také na nepolární (hydrofóbní) a polární (hydrofilní) podle postranního řetězce. Do tohoto rozdělení ale opět nemůžeme zahrnout glycin.

Aminokyseliny mají bipolární charakter, řadí se tedy mezi amfolyty, neboli chovají se jako kyseliny i jako zásady podle pH prostředí. Je-li náboj amfolytu nulový, říkáme, že je v izoelektrickém stavu, který je charakterizován hodnotou pH roztoku, v němž amfolyt neputuje v elektrickém poli. Toto pH se nazývá izoelektrický bod pI [4].

2.1.2.2 Kovalentní struktura

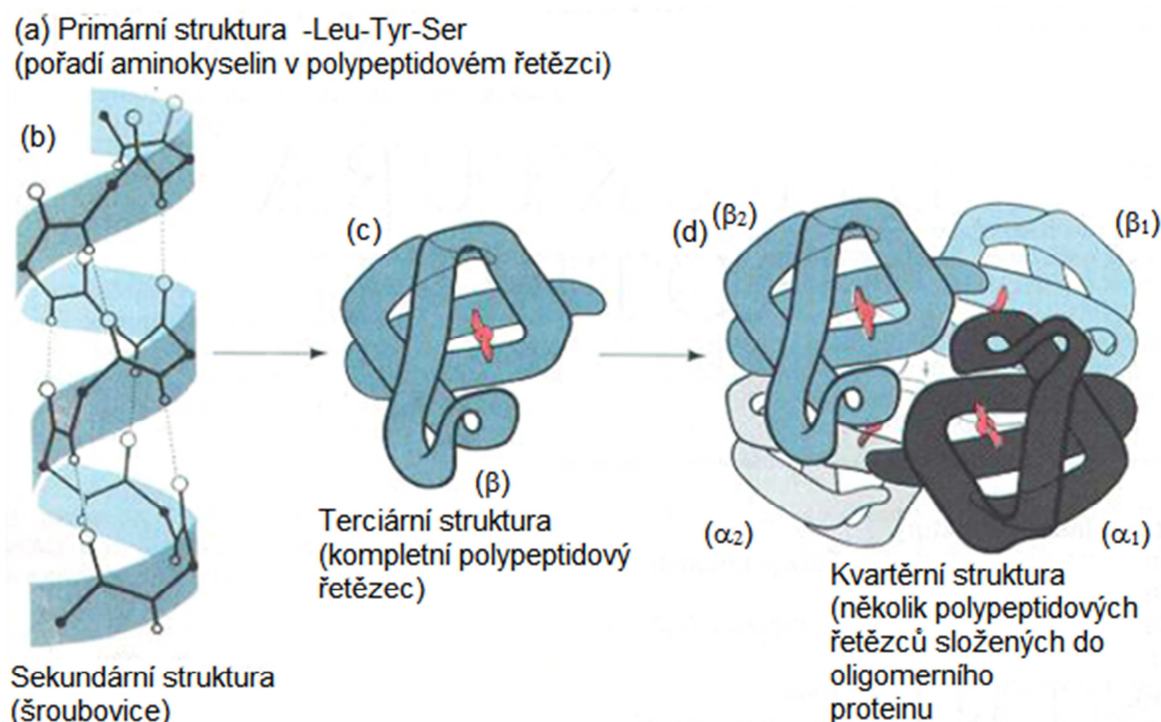
Základním prvkem enzymů i všech ostatních druhů bílkovin je peptidová vazba [4]. Vzniká kondenzací karboxylové skupiny a aminokyseliny za odštěpení vody [2]. Jejím prostřednictvím jsou spojeny jednotlivé aminokyselinové jednotky v polymerním řetězci [4].



Obr. 2: Znáznornění peptidové vazby v primární struktuře bílkovin [24]

Řetězec tvořený ze dvou a více aminokyselin spojených peptidovou vazbou se označuje peptid [2]. Sekvence monomerních jednotek v biopolymerním řetězci se nazývá primární struktura, což je první ze čtyř úrovní struktury proteinu [4]. Pořadí aminokyselin se zapisuje zkratkami [2]. Sekundární struktura je prostorové uspořádání v určitém místě hlavního řetězce bez ohledu na jeho postranní řetězec, buďto α -helix nebo β -skládaný list. Terciární strukturou se rozumí trojrozměrná struktura celého polypeptidu a kvartérní struktura se vztahuje k prostorovému uspořádání jejich podjednotek, což znamená, že se protein skládá

ze dvou či více polypeptidových řetězců, které jsou vzájemně spojeny nekovalentními vazbami a v některých případech i disulfidickými můstky [5].



Obr. 3: Struktura hierarchie proteinu [5]

2.1.3 Substrátová specifita

V roce 1894 vyslovil E. Fisher teorii klíče (substrátu) a zámku (enzym), tzv. teorii komplementarity, která se snažila vysvětlit substrátovou specifitu činnosti enzymu [4]. Její podstatou je, že účinná je pouze omezená část molekuly, aktivní centrum, které tvoří oblast umožňující kontakt pouze se substrátem, který má přesnou geometricky doplňkovou strukturu. Tato představa snadno vysvětlí, proč enzym nepůsobí na látky, které mají větší molekulu než specifické substráty [1,4].

Na počátku 20. století vznikla druhá teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové, jejímž předpokladem je vázání molekul enzymu na substrát za tvorby meziproduktu a jeho existence byla opakovaně prokázána [1,6].

V 70. letech se pomocí rentgenové strukturní analýzy krystalů enzymů umožnil výklad mechanismu činnosti enzymů v pojmech struktury jejich molekul. Zjistilo se tedy, že při realizaci katalytických funkcí hrají důležitou roli konformační změny a teorie zámku a klíče byla nahrazena představou ruka v rukavici, kdy aktivní centrum není předem zformovaná struktura, ale substrát vyvolá změnu konformace enzymu [6].

Katalytický účinek enzymů spočívá v realizaci mechanismu s aktivační energií nižší než u nekatalyzované reakce. Nejprve se váže substrát na aktivní centrum nacházející se v bílkovinné části enzymu za vzniku komplexu enzym-substrát. V aktivním centru vázaný substrát se dostává do přímého kontaktu s vhodně nasměrovanými katalytickými skupinami, což umožní hladký průběh reakce [1,6].

2.1.4 Katalytická účinnost

Od roku 1961 zavedla enzymová komise IUB mezinárodní jednotku aktivity 1U, která představuje množství enzymu katalyzujícího při 30 °C a optimálním pH přeměnu 1μmol substrátu za minutu. V této práci je upřednostňovaná jednotka U vztažená na 1 ml.

V roce 1972 po zavedení jednotek SI byla definovaná jednotka katal. 1 kat představuje množství katalyzátoru, které přemění za standardních podmínek za 1 sekundu 1 mol substrátu. Jelikož je tato jednotka vysoká, jsou uváděny její zlomky, respektive nanokataly ($\text{nkat} = 10^{-9} \text{kat}$) [1].

Vztah určující přepočítání z U na kat je $1 \text{ U} = 16,67 \cdot 10^{-9} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$ [4].

2.2 Pankreatin

Co se týče vizuálních vlastností, pankreatin je amorfni prášek krémové barvy a charakteristického zápachu částečně rozpustný ve vodě a nerozpustný v alkoholu [7]. Pankreatin je souhrnný název pro směs enzymů vylučovaných slinivkou břišní. Pankreatické enzymy pomáhají trávit bílkoviny, sacharidy i lipidy a podle toho, jaké složky potravy rozkládají, se rozdělují podle účinku do tří tříd.

2.2.1.1 Proteázy

Proteázy neboli proteolytické enzymy katalyzují proteolýzu, což je hydrolytické štěpení bílkovin. Proteázy se dělí do dvou skupin, na endopeptidázy (proteínázy), které katalyzují hydrolyzu uvnitř řetězce za vzniku peptidů různé velikosti, a na exopeptidázy, které katalyzují hydrolytické štěpení pouze koncové aminokyseliny z polypeptidového řetězce. Proteázy nejsou substrátově specifické, štěpí tedy všechny bílkoviny, ale vykazují specifitu k určitým strukturám polypeptidového řetězce. Aktivovaná pankreatická šťáva obsahuje 7 proteáz, a to endopeptidázy trypsin, chymotrypsin A, B, C a elastázu. Mezi exopeptidázy patří karboxypeptidáza A a B [1].

2.2.1.2 Amylázy

Amylázy jsou enzymy katalyzující štěpení oligo a polysacharidů pomocí hydrolytického štěpení na monosacharidy, nejčastěji glukózu, což je hlavní zdroj energie pro metabolismus. Nejdůležitějšími enzymy jsou glukosidázy amylázy, tedy α -amyláza, která odbourává amylozu, tedy nevětvený polypeptid. Pro štěpení větvených polypeptidů slouží enzym amyloglukosidáza a maltáza pak štěpí disacharid maltózu. Na trávení sacharidů se podílí ještě další enzymy jako např.: izomaltáza, laktáza a sacharáza [1,5].

2.2.1.3 Lipázy

Lipázy, nebo karboxylesterázy jsou enzymy katalyzující hydrolytické odbourávání lipidů tím, že štěpí triacylglyceroly na mono- a diacyl glyceroly a sodné či draselné soli mastných kyselin neboli mýdel. Ty jsou amfipatické, napomáhají tedy emulgaci lipidů a usnadňuje jejich štěpení. K aktivaci potřebují emulgující látky a vápenaté ionty [1,5].

2.2.2 Příprava

Výroba pankreatinu spočívá ve zpracování surové slinivky břišní macerací s chloroformem a vodou. Dále je směs rozpuštěna v kyselině borité s glycerolem a následně zfiltrována a přebytečná rozpouštědla jsou odpařena [7].

2.2.3 Využití

Nejčastější využití nachází pankreatin v léčbě trávicích potíží způsobených dysfunkcí slinivky břišní, tedy v medicínské oblasti. Je také vhodným doplňkem stravy pro starší pacienty trpícími horším zažíváním. Průmyslové využití také vyplývá z jeho enzymatických vlastností, kdy je použit především k čištění produktů obsahujících enzymaticky rozložitelné i nerozložitelné materiály.

2.2.3.1 Průmyslové využití pankreatinu

Hlavní průmyslové využití spočívá v použití proteázové aktivity k čištění materiálů od enzymaticky rozložitelného materiálu (buňky, tkáně), kdy zůstávají enzymaticky nerozložitelné materiály (kolagen, keratin a další). Tento princip je využit např. při moření kůže nebo při rozkladu kafilerních zbytků [8].

Jedna z dalších možností průmyslového využití pankreatinu je v rámci jeho proteolytické aktivity aplikace do čistících roztoků kontaktních čoček, které jsou jinak citlivé na jiné typy čištění. Účinek spočívá v cíleném odbourání biologického materiálu ulpěného na čočkách. Součástí takového preparátu je také netoxická organická povrchově aktivní látka, případně chelatační činidlo a močovina [9]. Obdobné využití nalézá pankreatin také při odstraňování škrobu a bílkovin z textilií [7].

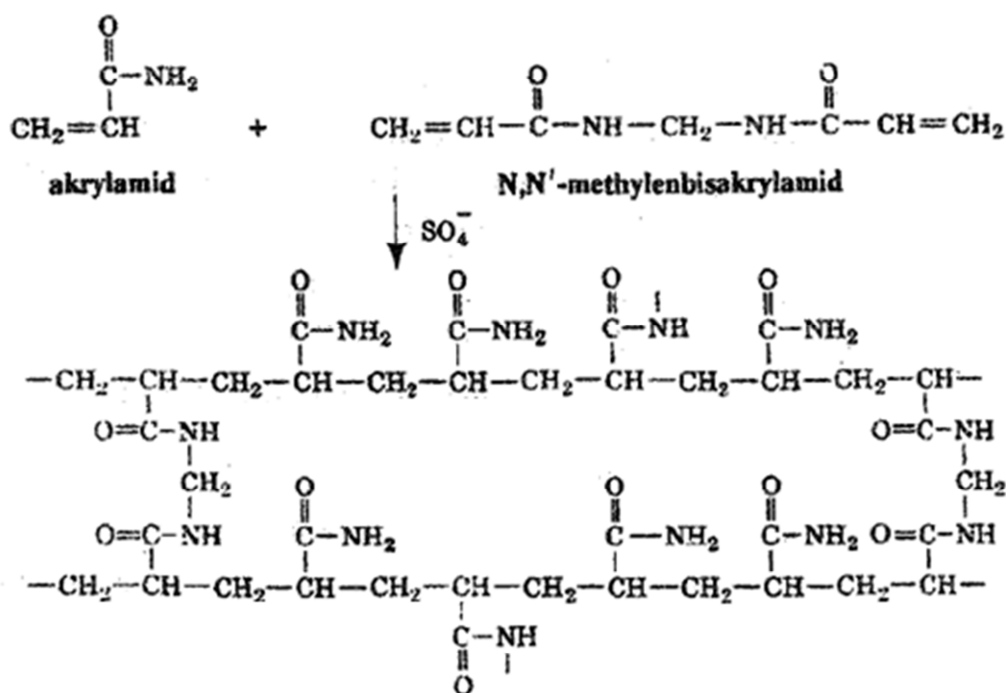
2.2.3.2 Využití pankreatinu v medicíně

Pankreatické enzymy neboli pankreatin jsou využívány v humánní i veterinární medicíně jako digestiva, např. jsou součástí komerčního preparátu Wobenzym [8]. Dále také při dysfunkcích slinivky břišní, případně onemocněních jako jsou záněty či rakovina. Své uplatnění pankreatin nalézá při léčbě diabetu, kdy je pomocí pankreatinu zlepšováno vylučování inzulínu [10]. Byl zaznamenán i úspěch při léčbě cystické fibrózy, jejímž příznakem jsou záněty slinivky břišní [8].

2.3 Elektroforéza

Elektromigrační nebo elektroforetické metody jsou techniky využívající k separaci pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Jestliže jsou částice nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, rozpohybují se konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, kdy anionty putují k anodě a kationty ke katodě. Částice jsou při průchodu okolním médiem vystaveny odporu sil vnitřního tření. V průběhu elektroforézy se ustanoví rovnováha mezi silami vnitřního tření a silou elektrického pole, budou mít tedy tyto síly stejnou hodnotu, ale opačného směru. Z toho vyplývá, že malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu, zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Elektroforéza se provádí na tzv. nosičích. Prvními používanými nosiči byly chromatografický papír, acetát celulózy, škrob, celulóza. V současnosti se používají gelové materiály [11]. Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. U běžně používaných gelů jako je agaróza, škrob nebo polyakrylamid lze ovlivnit separaci změnou velikosti pórů odlišným poměrem složek gelu. Používaný nosič by měl být stabilní, inertní, vodivý, hydrofilní a nerozpustný ve vodě a jeho struktura nesmí bránit migraci iontů ve vodném prostředí, což polyakrylamidový gel splňuje. Vzniká polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\cdot -}$) neboli APS. Stabilizátor radikálů ve směsi se provádí přidávkou TEMEDu (N,N,N',N'-

tetramethylethyldiamin). Nejčastěji používané celkové koncentrace akrylamidu jsou 3 – 15% [12,11].



Obr. 4: Struktura polyakrylamidového gelu [11]

Existují dva typy experimentálního uspořádání elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Řeč je o elektroforéze v trubičkách nebo v plošném uspořádání neboli v tenké vrstvě [11]. Dělení technik vertikální PAGE není podle typu gelu či jeho tvaru, ale podle toho, zda je v kontinuálním nebo diskontinuálním systému [12]. Kontinuální systémy mají nevýhodu v podobě vyššího stupně difuze u menších molekul s vyšší rychlostí prostupu gelem. K vyřešení problému byla zavedena diskontinuální elektroforéza [11]. Velmi ostré zóny se získávají touto diskontinuální elektroforézou při použití dvou různých gelů a několik odlišných pufrů o různém pH. Separační gel neboli dolní gel je překryt cca 1 cm vrstvou tzv. zaostřovacího neboli startovního gelu s velkými póry. Zaostřovací gel a vzorkovací pufr obsahují Tris-chloridový pufr, jehož pH 6,8 je o dvě jednotky nižší než má pufr dělicího gelu pH 8,8. Elektrodotový roztok obsahuje Tris-glycinový pufr o pH 8,3. V prostředí zaostřovacího gelu je nejpohyblivějším anionem chloridový ion, pohyblivost komponent vzorku bílkovin je tedy menší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Hodnota intenzity proudu je nastavena na konstantní velikost, seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí, dochází k vzniku ostře ohraničených za sebou následujících zón iontů. Rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu, projevuje se samozaostřující efekt (zpozdí-li se některý ion za zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí a naopak. Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší hodnotu pH, se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridových iontech a současně v důsledku různé pohyblivosti v gelové matici dochází k rozdělení zón podle náboje a velikosti od sebe. Pohyb čela se indikuje přidáním

nízkomolekulárního barviva bromfenolové modři ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem [12].

V této práci se setkáme s variantou PAGE s anionaktivním detergentem dodecylsíránem sodným (PAGE-SDS), který nese záporný náboj a ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin. Bílkoviny se pohybují v gelu již jen podle velikosti [11]. SDS se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na gram bílkoviny a udílí jim uniformní záporný náboj. Nabité skupiny jsou pak v kontaktu s pufrům. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidické můstky např.: pomocí látek redukujících disulfidové můstky jako jsou merkaptoethanol nebo dithithreitol. V dalším kroku se provádí zahřátí vzorku na 60 či 100 °C po několik minut. Z kalibračních grafů závislosti relativní vzdálenosti R_f na logaritmu relativní molekulové hmotnosti $\log M_r$ standardů lze stanovit molekulovou hmotnost vzorku [12]. Nevýhodou této metody je inaktivace a denaturace enzymu [11].

2.3.1 LPLC

2.3.1.1 Obecná charakteristika chromatografie

Chromatografie je široce používanou metodou pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty a patří dnes k nejvýznamnějším analytickým i preparativním metodám [13]. Chromatografie je tedy kvalitativní separační metoda, kde se oddělují složky obsažené ve vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní, kde stacionární je pevná látka nebo s ní nepohyblivě spojený povlak kapaliny, která je vlastní účinnou složkou chromatografického zařízení, kdežto mobilní fáze je kapalina nebo plyn, která unáší složky dělené směsi přes stacionární fázi. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze se dostává vzorek přes celou stacionární soustavu. Složky vzorku, které jsou ve stacionární fázi zachycovány, se při pohybu opoždují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Nejrychleji se na konec stacionární fáze dostanou složky stacionární fází téměř nezadržované. Touto metodou se složky vzorku od sebe separují [11,13].

2.3.1.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství, a proto se rozdělují do skupin podle několika kritérií:

Podle účelu

Analytická chromatografie: slouží k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi a pracuje obecně s velmi malým množstvím vzorku.

Preparativní chromatografie: jednotlivé složky směsi od sebe rozdělit v dostatečném množství, aby bylo možno dále je zpracovávat a využít [13].

Podle skupenství mobilní fáze a techniky

Kapalinová chromatografie neboli Liquid Chromatography (LC): mobilní fází je kapalina.

Plynová chromatografie neboli Gas Chromatography (GC): mobilní fází je plyn [14].

Podle uspořádání stacionární fáze

Sloupcové techniky:

Kolonová chromatografie nízkotlaká: stacionární fáze je umístěna v koloně (skleněné) a mobilní fáze jí protéká pomocí gravitace či čerpadla.

Kolonová chromatografie vysokoúčinná: stacionární fáze je umístěna v koloně (kovové), kdy mobilní fáze jí protéká za pomoci pump.

Plošné techniky:

Papírová chromatografie neboli Paper chromatography (PC): stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkovrstvá chromatografie neboli Thin layer chromatography (TLC): stacionární fáze je umístěna na pevném plochem podkladu např.: skleněné desce nebo hliníkové fólii [14,13].

Podle povahy děje převládající při separaci

Při separaci se zároveň uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů, jeden z nich však převládá.

Rozdělovací chromatografie: o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi.

Adsorpční chromatografie: o separaci rozhoduje různá schopnost složek adsorbovat se na povrch pevné stacionární fáze.

Iontově – výměnná chromatografie (ionexová): o separaci rozhodují různě velké elektrostatické síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze, který je v tomto případě iontoměničem, a ionty vzorku.

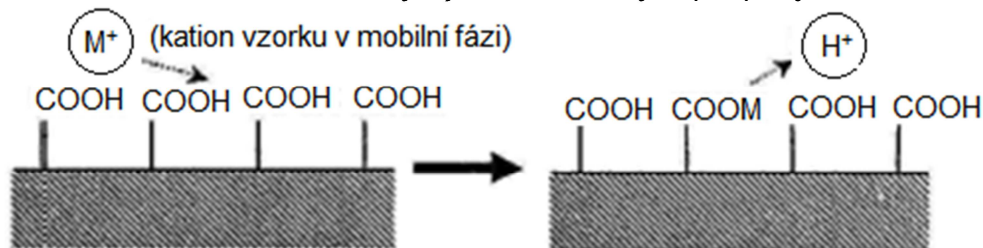
Gelová (permeační) chromatografie (gelová filtrace): složky se separují podle velikosti na gelové pórovité stacionární fázi na principu molekulové síťového efektu.

Afinitní chromatografie: složky se separují pomocí stacionární fáze schopné vázat určité složky vzorku, ke kterým má afinitu neboli úzce selektivní vztah [14,13].

V této práci se pracovalo s nízkotlakou kapalinovou chromatografií (LPLC) ve dvou obměnách, a to iontově – výměnná a gelová filtrace.

2.3.1.3 Iontově – výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie neboli ion Exchange Chromatography (IEC) je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů. Její stacionární fází je měnič iontů, kterým bývá makromolekulární matrice např.: polystyren, celulóza, dextran aj. s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. V protékající mobilní fázi jsou přítomné ionty opačného náboje a jsou elektrostatickými silami přitaženy a dostatečně pevně zadrženy na povrchu stacionární fáze. Mobilní fází bývají vodné roztoky např.: pufrů.



Obr. 5: Výměna iontů na povrchu iontoměniče [14]

Ionexy neboli iontoměniče se dělí na anexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů, a katexy, jejichž funkční skupiny jsou kyselé a slouží k výměně kationtů. Nejčastějšími skupinami chemicky vázanými na povrchu anexů podle vzrůstající síly jsou: primární aminy $-NH_2$, sekundární aminy $-NHR$, terciární aminy $-NR_2$ a kvartérní amoniové báze $-N^+R_3$.

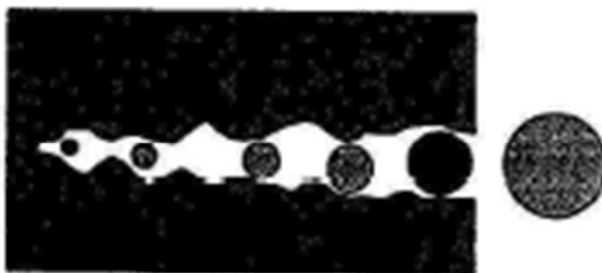
U katexů se potom setkáváme podle vzrůstající síly se skupinami kyselými: fenolická skupina $-OH$, karboxylová skupina $-COOH$, fosfátová skupina $-PO(OH)_2$ a sulfátová skupina $-SO_3H$.

Iontová chromatografie se hojně používá k separaci slabých organických kyselin a zásad i anorganických iontů. Je to oblíbená metoda pro separaci léčiv, nukleových kyselin, aminokyselin, lanthanoidů i aktinoidů.

Retence (zdržení) je řízena změnou pH nebo změnou iontové síly pufru [14,13].

2.3.1.4 Gelová filtrace

U gelové permeační chromatografie neboli Gel Permeation Chromatography (GPC) nebo také Size Exclusion Chromatography (SEC) jsou molekuly separovány podle své velikosti díky rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek rozdělovány mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze se nachází mezi jednotlivými zrny a stacionární fází je samotný gel. Malé molekuly tedy pronikají hlouběji do pórů gelu a budou se vyplavovat z kolony jako poslední, zatímco velké molekuly se do pórů nedostanou a jsou mobilní fází eluovány jako první.

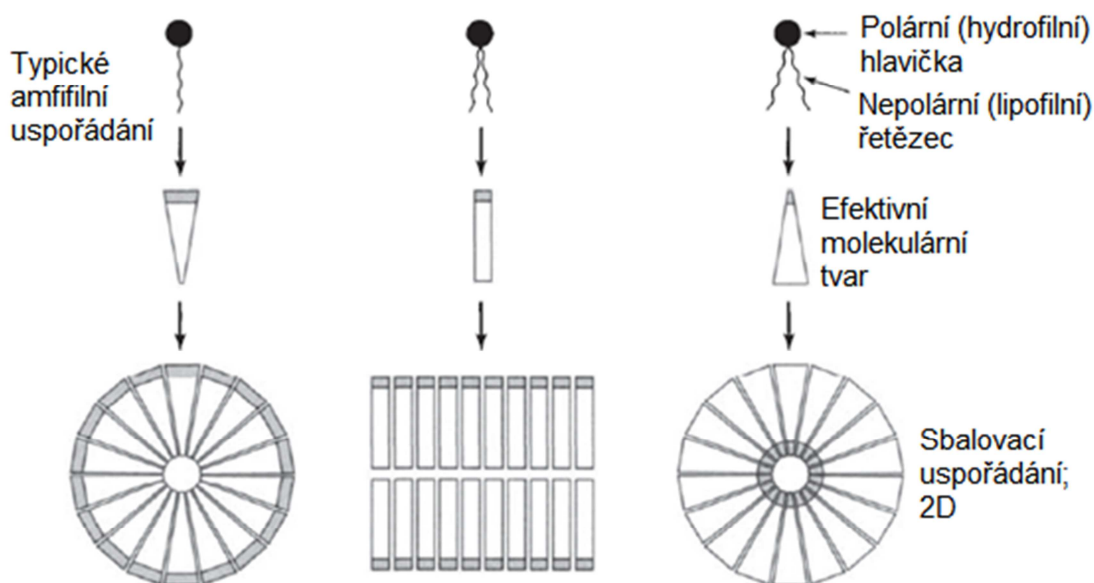


Obr. 6: Permeace molekul o různé velikosti v póru gelu [14]

GPC slouží pro dělení směsí vysokomolekulárních látek, hlavně bílkovin, podle jejich molekulových hmotností. Nezbytnou podmínkou pro chromatografii je, aby materiál dělicího média byl ke všem děleným složkám zcela inertní a specificky nezadržoval žádnou z nich [14,13].

2.4 Liposomy

Liposomy jsou mikročástice tvořené vysoce organizovanými lipidovými molekulami rozptýlenými obvykle v hydrofilním rozpouštědle, nejčastěji ve vodě. Charakteristickým rysem liposomů je lamelární uspořádání lipidových částí [15]. Tyto lipidové části mají amfifilní charakter, což znamená, že musí obsahovat jak hydrofobní, tak i hydrofilní konce, které mají tendenci se k sobě natáčet a vytvářejí dvojvrstvu [11]. Podle typu rozpouštědla jsou známy různé formy uspořádání lipidové dvojvrstvy, viz. Obr. 7. Díky konformaci, kterou vytvářejí, jsou ideálními částicemi, pro použití k enkapsulaci.



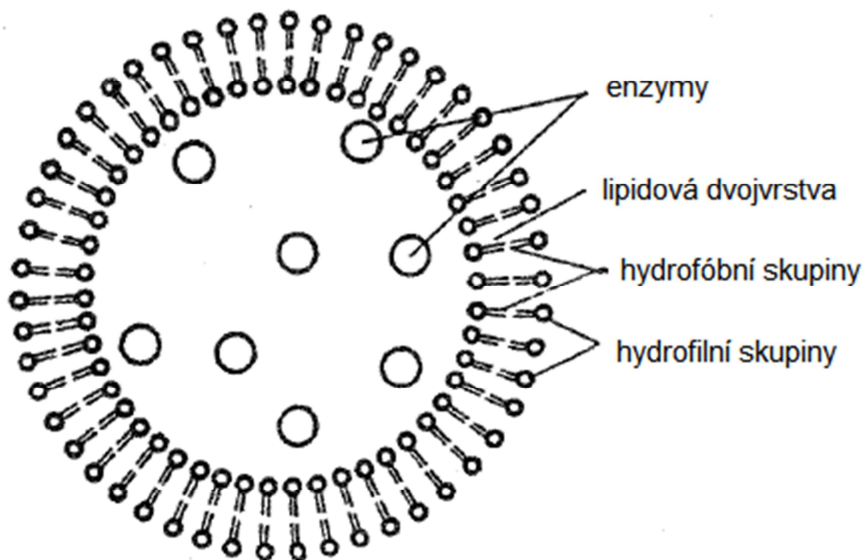
Obr. 7: Struktury liposomů v rozdílných rozpouštědlech [15]

2.4.1.1 Enkapsulace do liposomů

Enkapsulace je proces, při kterém jsou vybrané molekuly, v našem případě enzymy, uzavřeny do částic. Tím je zabráněno difuzi enzymu do okolního prostředí [11].

Při třepání ultrazvukovými vlnami tzv. sonikaci s enkapsulovanou látkou se fosfolipidové struktury přeskupují a vytváří liposomy s látkou zabudovanou do jeho struktury [5]. Podle charakteru látky se zabuduje do různých částí liposomu. Ve vodném prostředí jsou hydrofobní látky zabudovány do lipidové dvojvrstvy a hydrofilní látky uvnitř liposomu [16].

Při liposomovém sbalování se vytváří měkké, neformovatelné a téměř kapalné lipidové membrány, srovnatelné s membránami buněk. Vzhledem ke křehkosti a neformovatelnosti liposomových částic není tato technika vhodná pro průmyslové aplikace, ale je velmi významná při aplikaci enzymů v medicíně [11].



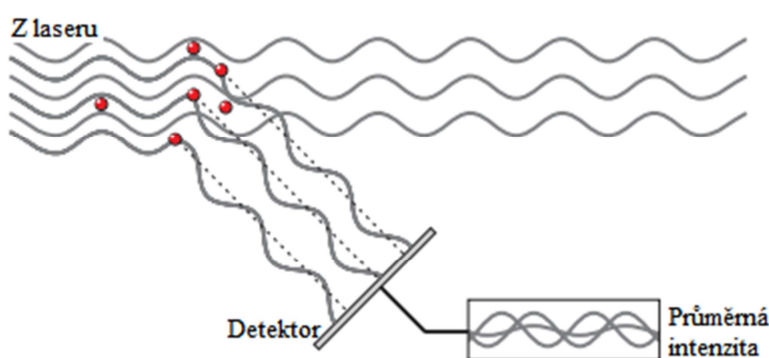
Obr. 8: Enzym enkapsulovaný do liposomu [11]

2.5 DLS metoda stanovování distribuce velikosti částic a zeta potenciálu

2.5.1 DLS

DLS neboli dynamický rozptyl světla je neinvazivní technika pro měření velikosti molekul a částic pro hodnoty velikostí od 1 nanometru po cca 4 mikrometry. Používá se k charakterizaci distribuce velikosti částic emulzí a dispergovaných koloidních částic v kapalině např.: proteinů, micel, polymerů, liposomů, atd..

Princip této metody spočívá v měření Brownova pohybu, což je náhodný pohyb částic v tekutém médiu vyvolaný neustálým srážením molekul roztoku vlivem tepelné energie. Částice osvětlené laserem se dostávají do kolize se světelnými paprsky, které se o ně následně rozptylují. Detektor analýzou výkyvů intenzity světla zjišťuje Brownův pohyb, ze kterého lze určit velikosti částic [17].

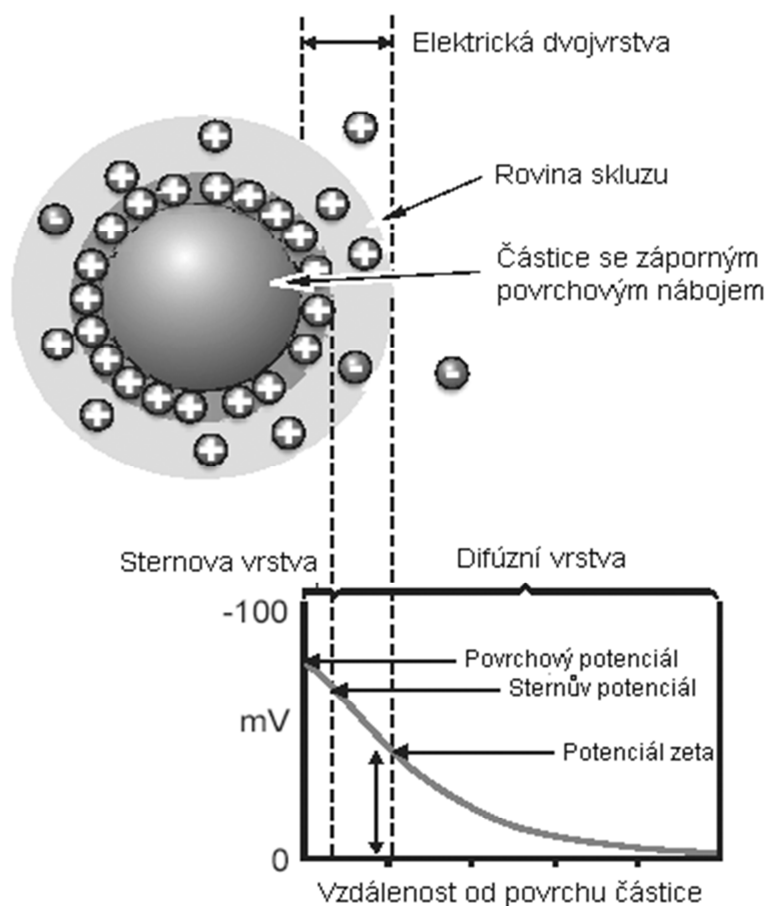


Obr. 9: Princip detekce rozptylu světla pomocí laseru [18]

2.5.2 Zeta potenciál

Měření zeta potenciálu se používá pro zjišťování stability disperzního systému. Zeta potenciál neboli elektrokinetický potenciál je jedna z hlavních sil, které zprostředkovávají mezičásticové interakce [17]. Povrch částice může získat náboj různými způsoby např.: sorpcí iontů z roztoku, což vede k vytvoření vrstvy kolem částice, která se nazývá elektrická dvojvrstva viz. Obr. 3. Struktura této dvojvrstvy měla tři teorie. Helmholtzova teorie říká, že elektrická dvojvrstva je kompletně vázána na povrch částice, což bylo vyloučeno existencí elektroforézy, která by nemohla fungovat, částice by se chovala jako elektroneutrální. Druhou teorií byla Gonyho difuzní, kdy povrch váže pouze ionty jednoho druhu, druhé ionty jsou vzdáleny. Třetí, a správná teorie, je Sternova, který říká, že elektrická dvojvrstva se skládá z pevné i difuzní (vzdálené) části a na částici zůstává parciální náboj viz. Obr. 3 [19].

Pevná část elektrické dvojvrstvy má lineární průběh potenciálu, který se nazývá povrchový potenciál. Difuzní část elektrické dvojvrstvy má zaoblenou křivku a nazývá se zeta potenciál viz. Obr. 3. Helmholtzova teorie může nastat v okamžiku, kdy zeta potenciál bude roven 0, mluvíme pak o izoelektrickém bodu a nastává koagulace. Čím větší je hodnota zeta potenciálu (nezáleží na znaménku), tím více se difuzní části odpuzují a tím zabraňují koagulaci. Koagulace započne, když se překročí hodnota prahu koagulace (mV), od překročení prahu až do izoelektrického bodu je oblast tzv. pomalé koagulace (± 30 mV), po dosažení zeta potenciálu rovného nule, koagulaci nic nebrání, jedná se tedy o oblast rychlé koagulace [19].



Obr. 10: Zeta potenciál, Sternova vrstva a jejich grafické znázornění [18,20]

Zeta potenciál je měřen pomocí elektrického pole v dispezním roztoku. Částice přecházejí k elektrodě s opačným nábojem a rychlostí úměrnou velikosti zeta potenciálu. Rychlost se měří za použití laserového anemometru [17].

3 Cíl práce

- 1) Optimalizace metod stanovení koncentrace pankreatinu a trypsinu základními spektrofotometrickými metodami
- 2) Identifikace pankreatinu a trypsinu pomocí PAGE-SDS
- 3) Stanovení teplotních a pH optim pankreatinu
- 4) Enkapsulace pankreatinu do liposomů, analýza enkapsulovaných částic a stability částic
- 5) Analýza enzymové aktivity enkapsulovaných částic

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Pankreatin, Sigma – Aldrich (Německo)
Azokasein, Sigma – Aldrich (Německo)
Albumin bovine, Serva (Německo)
Trypsin, Sigma – Aldrich (Německo)
Lipáza z pankreatinu, Sigma – Aldrich (Německo)
Glycin, Serva (Německo)
Nitrofenylpalmitát, Sigma – Aldrich (Německo)

4.1.2 Přístroje

IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
ELISA ReaderBioTek ELx808
Sada BIORAD Mini-PRTOEAN®
Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer ZS
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline
Centrifuga Boeco
Analytické váhy Boeco
Nízkotlaká kapalinová chromatografie BioLogic LP, BioRad

4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Pro kvantifikaci proteinů existuje řada metod. Mezi ty nejzákladnější patří např.: ninhydrinová metoda, stanovení z UV spektra, Bradfordova metoda Kjeldahlova metoda, metody založené na interakci proteinů s ionty mědi, což jsou Biuretová metoda, Hartree-Lowryhoi (H-L) metoda, Bicinchoninová metoda. V této práci byly použity metody Biuretová, H-L a Bradfordova [12].

4.2.1 Biuretová metoda

Biuretová metoda je založena na interakci proteinů (albuminu, pankreatinu) s ionty mědi v alkalickém prostředí za vzniku chelátů. Vytváří se modrofialové zbarvení, které je detekovatelné spektrofotometrem při 550 nm. Tato metoda je relativně méně citlivá, vhodná koncentrace vzorku by měla být 1 – 10 mg proteinu v 1 ml.

Albumin, trypsin i pankreatin byly touto metodou stanoveny. Jako bílkovinný standard byla použita koncentrace 3 mg/ml. Ze standardu bylo postupně odebíráno takové množství, aby výsledná koncentrace po doplnění destilovanou vodou na 3 ml byla od $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. K takto připraveným roztokům bylo přidáno 0,3 ml biuretového činidla a po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm oproti blanku [12].

4.2.2 Hartree-Lowryho metoda

H-L je kolorimetrická metoda založená na trojsložkovém činidle. Prvníma dvěma složkami jsou ty samé jako u biuretového stanovení (obsahuje vinan sodno-draselný,

uhličitan sodný, hydroxid sodný a skalici modrou) a třetí složkou je Folin–Ciocalteu činidlo na fenoly (obsahuje polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrozinovými zbytky proteinů a barví se modře). Dle intenzity zbarvení lze stanovit koncentraci proteinu spektrofotometricky. Metoda je citlivější než biuretová, detekční limit je 0,1 – 0,6 mg/ml.

Opět byly touto metodou stanovovány všechny tři proteiny. Jako bílkovinný standard byl použit roztok o koncentraci 0,3 mg/ml. Ze standardu bylo postupně odebíráno takové množství objemu, aby po doplnění destilovanou vodou byla celková koncentrace proteinu od 0,03 do 0,15 mg/ml. K jednomu ml takto připraveného proteinu bylo přidáno H–L činidlo A, poté byly vzorky inkubovány při 50 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu, přidalo se k nim 0,1 ml H–L činidla B, nechaly se 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě, poté byly přidány 3 ml H–L činidla C a po opětovné inkubaci po dobu 10 minut ve vodní lázni o 50 °C byla změřena absorbance vzorků oproti blanku při vlnové délce 650 nm v 1 cm kyvetách [12].

4.2.3 Bradfordova metoda

Bradfordova metoda využívá Coomassie Brilliantovou modř k navázání na protein v kyselém prostředí. Po vazbě barviva dochází k barevné změně, která je přímo úměrná množství proteinu ve vzorku. Coomassie barvivo se na molekuly proteinu váže dvěma způsoby. Trifenylnmethanová skupina se váže na nepolární část proteinu a anion sulfoskupiny se váže na vedlejší řetězcové aminokyselin nesoucí kladný náboj. Bradfordova metoda je ze všech tří použitých nejcitlivější. Detekční limit je již od 0,02 – 0,1 mg/ml.

Jako bílkovinný standard albuminu, trypsinu a pankreatinu byla použita koncentrace 0,25 µg/ml. Ze standardu bylo odebíráno takové množství objemu, aby byla konečná koncentrace proteinu v rozmezí od 12,5 – 75 µg/ml. K 1 ml takto připraveného roztoku proteinu byly přidány 2 ml činidla Bradfordové a vzorek byl zamíchán. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 595 nm oproti blanku [12].

4.3 Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti

Proteiny, které obsahují tyrosin a tryptofan absorbují UV světlo v oblasti spektra kolem 280 nm. Fenylalanin absorbuje jen velmi slabě a jeho absorbance se zanedbává. Při kratších vlnových délkách, např. při 205 nm absorbují peptidové vazby [12].

4.4 Stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy

Příprava vertikální diskontinuální PAGE-SDS zahrnuje sestavení formy na polyakrylamidový gel, přípravu samotného gelu dělicího a zaostřovacího a přípravu vzorků. Nezbytná podmínka úspěšné separace jsou odmaštěná a dokonale umytá skla [12]. Pomocí sady BIORAD mini-protean se skla přichytí k sobě a vloží do stojanu. Poté se připraví dělicí gel o hustotě 14 %, na který bylo použito 2,7 ml Mili Q vody, 4,7 ml akrylamidu (Rothiphorese od firmy Roth), 2,5 ml 1,5 M pufru Tris-HCl o pH 8,8, a 0,1 ml 10% SDS a pro iniciaci polymerace bylo přidáno 50 µl 10% APS s 5 µl TEMEDu. Takto připravený gel byl pomocí pipety vpraven mezi skla asi centimetr pod okraj, na něj byla navrstvena milimetrová vrstva butanolu pro vodorovnou rovinu gelu a ponechán hodinu tuhnout. Poté byla vrstva butanolu promyta a vysušena a byl připraven 8% zaostřovací gel s 4,7 ml Mili Q vody, 2,7 ml akrylamidu (Rothiphorese od firmy Roth), 2,5 ml 0,5 M pufru Tris-HCl o pH 6,8, a 0,1 ml

10% SDS a opět pro iniciaci polymerace bylo přidáno 50 μ l 10% APS s 5 μ l TEMEDu. Gel byl nalit na dělicí gel až po okraj a do aparatury byl vložen hřebínek, gel byl opět ponechán hodinu k zatuhnutí. Poté byly skla vloženy a uchyceny do aparatury, do které se nalilo asi 800 ml 10x zředěného elektrodového pufru o pH 8,3. Dále byly připraveny vzorky pankreatinu, trypsinu, lipázy z pankreatinu a standardů ALL blue od firmy BIORAD, Color Burst (Sigma) a Servy. 0,1 g vzorku bylo dolito 1 ml Mili Q, z tohoto roztoku bylo odebráno 50 μ l a doplněno dalšími 50 μ l vzorkovacího pufru. Takto připravené vzorky byly 4 minuty povařeny a nanесeny do drážek vytvořených hřebíkem v zatuhlém gelu. Standardy byly přímo nanесeny na gel. Objem nanášeného vzorku byl od 5 – 20 μ l. Po nanесení vzorků se aparatura připojila ke zdroji stejnosměrného napětí o 100V, 400 mA na 120 minut [21].

4.5 Stanovení pH optima vybraných pankreatických enzymů

Proteinové enzymy jsou vysoce citlivé na změnu pH. Většina enzymů je aktivní jen v úzkém rozmezí pH mezi 5-9. U pankreatinu je hodnota vyšší kolem pH 7-10, jelikož se tento enzym vylučuje do dvanáctníku, kde je lehce zásadité prostředí. Hodnota pH, při kterém enzymová reakce probíhá nejrychleji, se nazývá pH optimum [12]. Závislost katalytické aktivity na koncentraci vodíkových iontů podmiňují protonovatelné skupiny, které jsou součástí aktivních center enzymů a molekul substrátů a jelikož reakce mezi enzymem a substrátem závisí na stupni jejich protonace, většina enzymů působí pouze v určité oblasti pH, mimo ni aktivita klesá [1]. Extrémní hodnoty pH mohou způsobovat ireversibilní změny struktury enzymu [12].

4.5.1 pH optimum proteázové aktivity pankreatinu

Stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu

Proteázová aktivita pankreatinu pomocí substrátu azokasein je závislá na štěpení azokaseinu na azooligopeptidy rozpustné v kyselině trichloroctové, kdy nedotčené molekuly azokaseinu se v prostředí trichloroctové kyseliny vysrážejí a následně se odseparují pomocí centrifugace. Po změření absorbance centrifugovaného vzorku se z rozdílu blanku a vzorku zjistí enzymová aktivita proteáz [22].

Do sady zkumavek bylo naváženo 20 mg azokaseinu a doplněno na objem 4 ml roztokem pufrů 0,2 M hydrogenfosforečnanu sodného s 0,1 M kyselinou citronovou o pH od 3 do 8 a 4 ml roztokem pufru 0,2 M hydroxidu sodného a 0,2 M glycinu o pH 9,0 až 9,8 (viz. Tab 1).

Tab. 1: Tabulka ředění pufrů

Zkumavka	[ml]		[-]
	Kys. citronová	Na ₂ HPO ₄	
1	3,20	0,80	3
2	2,60	1,40	4
3	2,00	2,00	4,8
4	1,60	2,40	5,8
5	0,70	3,30	7
6	0,10	3,90	8
-	NaOH	Glycin	-
8	4,4	25	9
10	13,6	25	9,8

Roztoky pufrů 0,2 M NaOH s 0,1 M glycinem byly doplněny destilovanou vodou na 100 ml a z tohoto roztoku byly odebrány 4 ml do sady zkumavek [12,23].

Ze zkumavek s rozpuštěným azokaseinem bylo odebráno 100 μ l a k tomuto objemu přidáno dalších 100 μ l roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Takto připravené roztoky byly inkubovány po dobu 45 minut při 30 °C. Blank byl připraven identicky, jen je kyselina trichloroctová přidala okamžitě po přidavku roztoku enzymu k zastavení enzymatické reakce. Po inkubaci se do všech vzorků přidalo 410 μ l trichloroctové kyseliny a roztoky byly zcentrifugovány při 10 000 otáčkách po 10 minut. Po centrifugaci byla změřena absorbance při 440 nm, kdy se do kyvety nepipetovalo 500 μ l centrifugovaného roztoku a 600 μ l 1M NaOH.

Stanovení proteázové aktivity pomocí albuminu

Proteázová aktivita pankreatinu pomocí albuminu je závislá na štěpení tohoto substrátu na jednotlivé aminokyseliny rozpustné v kyselině trichloroctové, kdy se nehydrolyzované molekuly albuminu vysrážejí a je možné je oddělit pomocí centrifugace. Po změření absorbance při vlnové délce 280 nm, kdy absorbují aromatické aminokyseliny tyrosin a tryptofan, se z rozdílu blanku a vzorku zjistí enzymová aktivita proteáz.

Postup byl identický jako u azokaseinu, jen s použitím albuminu. Absorbance byla měřena při 280 nm, bez přidavku 1M NaOH.

4.5.2 pH optimum amylázové aktivity pankreatinu

PH optimum amylázové aktivity pankreatinu se určuje štěpením škrobu amylasou. Stupeň štěpení polysacharidu určujeme jednak orientační reakcí s jodem a jednak kvantitativně z přírůstku redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona [12].

Do sady zkumavek byly napipetovány 4 ml roztoků pufrů o pH od 3 do 9,8, stejně jako u pH optima proteázové aktivity a pufru 0,2 M hydroxidu sodného s 0,2 M hydrogenfosforečnem sodným o pH 11,5 podle následující tabulky:

Tab 2: Příprava nových pufrů pro pH optimum amylázy

Zkumavka	[ml]		[-]
	Kys. citronová	Na ₂ HPO ₄	pH
1	0,00	4,00	8,3
-	NaOH	Na ₂ HPO ₄	-
2	11,1	0,2	11,5

Roztok pufru NaOH s hydrogenfosforečnanem sodným byly doplněny destilovanou vodou na 100 ml a z tohoto roztoku byly odebrány 4 ml do zkumavky [12,23,26].

Do všech zkumavek byl odměřen 1 ml 1% škrobu a poté byl přidán 1 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml a vzorky byly ponechány po dobu 1 hodiny při teplotě 30 °C. Poté byl z každého vzorku odebrán do čisté zkumavky 1 ml vzorku. Do každé zkumavky se vzorkem bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I (24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g bezvodého Na₂SO₄ a 12 g vinanu sodno-draselného neboli Seignettova sůl v 800 ml destilované vody) a II (4 g CuSO₄.5 H₂O a 24 g bezvodého Na₂SO₄ v 200 ml destilované vody). Zkumavky byly umístěny do vroucí vodní lázně a vařily se 10 minut. Poté byly zkumavky ochlazené vodou, přidalo se 0,5 ml činidla III (25 g molybdenanu amonného v 450 ml vody a 21 ml koncentrované H₂SO₄, poté přidáno 3 g Na₂HasO₄.7 H₂O

v 25 ml vody) a zkušavky byly promíchány, dokud se vzniklý Cu_2O nerozpustil. Po doplnění objemu na 10 ml byla změřena absorbance oproti slepému vzorku při 720 nm [12].

4.5.3 pH optimum lipázové aktivity pankreatinu

Princip metody spočívá v použití p-nitrofenylpalmitátu jako substrátu, kdy pomocí lipolytických enzymů se substrát hydrolyticky štěpí na p-nitrofenol (PNF), který je barevný a jeho množství ve vzorku se určuje spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm [27].

Nejdříve byl připraven pufr od pH 3 - 9,8 dle Tab. 1, poté byl připraven roztok substrátu, kdy 25 mg nitrofenylpalmitátu bylo rozpuštěno ve 20 ml etanolu. Na destičku pro měření na přístroji ELISA reader bylo napipetováno 230 μl pufru, k tomuto objemu bylo přidáno 50 μl substrátu a reakce byla iniciována 50 μl roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Pomocí ELISA readeru byla proměřena absorbance vzorku při 405 nm po minutových intervalech po dobu 10 minut [27].

4.6 Stanovení teplotní aktivity pankreatinu

Rychlost enzymových reakcí je také závislá na teplotě. S rostoucí teplotou vzrůstá i enzymová aktivita současně ale dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace bílkoviny. Výsledkem těchto dvou protichůdných jevů je teplotní optimum. Poloha maxima je dána termolabilitou enzymu, které je u živočišných enzymů kolem 50 až 60 °C a dobou měření, tedy když se měří teplotní optimum kratší dobu, proces tepelné inaktivace se téměř neuplatní a naměřená optimální teplota bude vyšší [1].

Principy všech tří složek aktivit pankreatinu jsou identické. Jedinou obměnou je postup, kdy z výsledků pH optim byla pro stanovení ideální teploty použita nejvýhodnější hodnota pH, při které enzym vykazoval nejvyšší aktivitu.

4.6.1 Teplotní optimum proteázové aktivity pankreatinu

Proteázová aktivita pankreatinu byla proměřena už jen se substrátem albuminem. Do sady zkušavek bylo naváženo 20 mg albuminu a doplněno na objem 4 ml roztokem pufru o pH 9,8 (ředění pufru viz. Tab. 1.). Z tohoto roztoku bylo odebráno 100 μl a smícháno se 100 μl roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Roztoky byly inkubovány 45 minut při 30, 40, 50, 60 a 70 °C. Blank byl připraven identicky, kyselina trichloroctová byla přidána okamžitě po přidavku roztoku enzymu. Po inkubaci se do vzorku přidalo 410 μl trichloroctové kyseliny a roztok byl zcentrifugován při 10 000 otáčkách po 10 minut. Po centrifugaci byla změřena absorbance při 280 nm.

4.6.2 Teplotní optimum amylázové aktivity pankreatinu

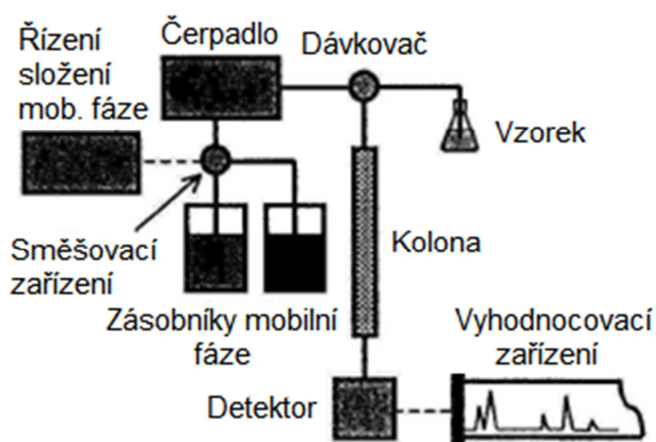
Do zkušavky byly napipetovány 4 ml roztoku pufru o pH 7. Do všech zkušavek byl odměřen 1 ml 1% škrobu a poté byl přidán 1 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml a vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 30, 40, 50, 60 a 70 °C. Po inkubaci byl ze vzorku odebrán 1 ml vzorku, k němu přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II. Zkušavky byly inkubovány 10 minut ve vroucí vodní lázni, poté byly ochlazeny vodou a přidalo se 0,5 ml činidla III, obsah byl promíchán po doplnění objemu na 10 ml byla změřena absorbance oproti slepému vzorku při 720 nm [12].

4.6.3 Teplotní optimum lipázové aktivity pankreatinu

Nejdříve byl připraven pufr o pH 7 dle Tab. 1, poté byl připraven roztok substrátu (25 mg nitrofenylpalmitátu ve 20 ml etanolu). Do sady zkumavek bylo napipetováno 0,92 ml pufru a k němu přimícháno 0,01 ml substrátu, iniciace reakce byla započata přidavkem 0,01 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Zkumavky byly inkubovány při 30, 40, 50, 60 a 70 °C po dobu 30 minut. Ihned poté byla změřena absorbance roztoků při 405 nm [27].

4.7 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a o separaci složek rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale i vhodně zvolená mobilní fáze. Kolona je naplněná stacionární fází, která je promývána mobilní fází (eluent). Vzorek se dávkuje na horní vrstvu stacionární fáze [14].



Obr. 11: Schéma kapalinového chromatografu [14]

4.7.1 Iontoměničová LPLC

Při iontoměničové LPLC byla použita menší náplňová kolona o velikosti 20 cm a průměru 1 cm. Jako stacionární fáze byla použita DEAE-Sephadex A-25, která sahala v koloně do 6,5 cm, mobilní fáze byl 20 mM Tris-HCl pufr o pH 8,3 a poté směšován s 50 mM puforem o stejném pH s 1 M NaCl. Dávkování vzorku bylo provedeno pomocí čerpadla. Průtok byl nastaven na 0,5 ml za minutu a v jednotlivých frakcích byly měřeny jednotlivé enzymové aktivity při optimálním pH a teplotě stejným způsobem jak v předchozích případech.

4.7.2 Gelová LPLC

Při gelové filtraci byla použita větší náplňová kolona o velikosti 27 cm a průměru 2 cm. Jako stacionární fáze byl použit Sephadex G-200, který sahal až do výše 17,5 cm, mobilní fáze byl 50 mM fosfátový pufr o pH 8,8. Průtok byl nastaven na 0,5 ml. Vzorek byl porovnán s identicky provedenou gelovou filtrací standardu.

4.8 Enkapsulace pankreatinu do lipozomů pomocí ultrazvuku

Principem enkapsulace do lipozomů je vytvoření roztoku fosfolipidů s molekulami látky vybrané k enkapsulaci. Fosfolipidy se pomocí působení ultrazvuku sbalí, a tak uzavřou do meziprostoru molekuly látky z roztoku. Zjištění enkapsulační účinnosti se provádí pomocí

rozdílu koncentrace původního roztoku enkapsulované látky a koncentrace látky v roztoku po enkapsulaci pomocí spektrofotometrického stanovení, kdy je po centrifugaci v supernatantu zjišťována koncentrace volných molekul enzymu vhodnou metodou.

Pro enkapsulaci pankreatinu byl vybrán lecitin s cholesterolem v poměru 9:1 se vzestupnou koncentrací 25, 100, 200 a 500 mg ve 20 ml roztoku enzymu o koncentraci 0,5 mg/ml. Takto namíchané roztoky byly po dobu jedné minuty ultravukovány, poté centrifugovány po dobu 30 minut na 14 000 otáček. Z takto připraveného roztoku byla zjišťována koncentrace volných molekul enzymu nacházející se v supernatantu metodou H-L identicky jako při stanovování kalibrační křivky.

4.8.1 Stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu

Z enkapsulovaného vzorku, připraveného viz. Enkapsulace pankreatinu do liposomů pomocí ultrazvuku, byl odlit supernatant obsahující volné molekuly enzymu. K usazenině sbalených enzymů v lecitinu byl nalit 1 ml pufru o pH 9,8 (optimální hodnota pro proteázovou aktivitu) a při teplotě 50 °C byl inkubován po dobu 1 hodiny. Poté byl roztok opět centrifugován po dobu 30 minut při 14 000 otáčkách, aby v supernatantu zbyly pouze molekuly enzymu uvolněných ze struktury liposomů. Ze supernatantu byla zjišťována proteázová aktivita stejným způsobem jako v předchozích případech. Bylo použito pH 9,8 a teplota 50 °C. Absorbance byla měřena při 280 nm.

4.8.2 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí

Enzym fosfolipáza byl nalezen v řadě rostlin, jako jsou mrkev, španát, zelí nebo i cukrová řepa a jiné. Největší množství je ho však zastoupeno v brukvovitých rostlinách a pro jeho aktivitu jsou nezbytné vápenaté ionty. Fosfolipázy působí na fosfolipidy a výrazně mění jejich náboje. V zelí je obsažena fosfolipáza D, která hydrolyzuje lecitin na kyselinu fosfatidovou a tím uvolní enzymy z fosfolipidového obalu [12].

Z enkapsulovaného vzorku, připraveného viz. Enkapsulace pankreatinu do liposomů pomocí ultrazvuku, byl odlit supernatant obsahující neenkapsulované molekuly enzymu. K usazenině byl napipetován 1 ml roztoku fosfolipázy D (6 g listů s 20 ml pufru Gly-NaOH o pH 9,8 s 1,94 g CaCl_2) a tento roztok byl inkubován po dobu 1 hodiny při 50 °C a poté centrifugován při 14 000 otáčkách po dobu 30 minut stejně jak v minulém případě. Ze supernatantu byla zjišťována proteázová aktivita, která byla také stanovována i v samotném roztoku fosfolipázy D.

4.9 Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu

Pomocí přístroje DLS Malvern Zeta sizer ZS byly proměřeny distribuce velikosti částic a jejich stability pomocí zeta potenciálu. Vzorky byly před měřením rozděleny a u první skupiny vzorků byl použit membránový extrudér, což je přístroj, který sjednocuje velikosti liposomů pomocí filtrování vzorku přes membránu s definovanou velikostí pórů, a u druhé skupiny vzorků membránový extrudér použit nebyl.

Připravené vzorky byly nepipetovány do kyvety, v případě vysoké koncentrace molekul ve vzorku naředěny přefiltrovanou destilovanou vodou. Kyveta byla vložena do DLS přístroje a přístroj následně vyhodnotil distribuci velikosti částic. Ve stejném vzorku byl zjištěn i zeta potenciál vložení speciální „deep“ cely do kyvety obsahující roztok liposomů [18].

5 Výsledky

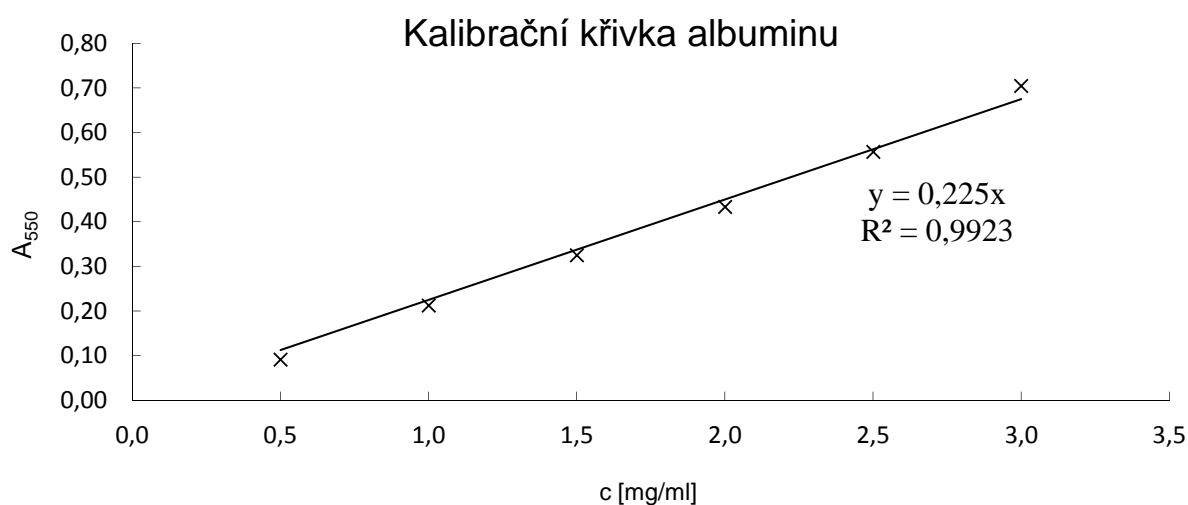
5.1 Výsledky stanovení koncentrace proteinů

5.1.1 Biuretová metoda

Kalibrační závislost koncentrace proteinu na absorbanci při 550 nm pro albumin a pankreatin, kde z bílkovinného standardu o koncentraci 3 mg/ml byl postupně odebírán takový objem, aby se koncentrace výsledného roztoku proteinu lineárně zvyšovala.

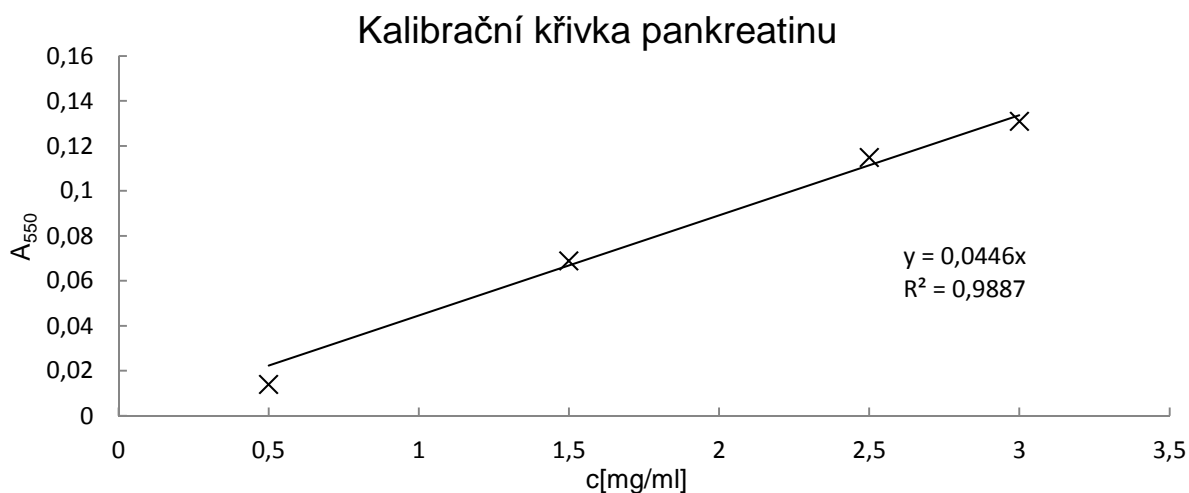
Tab. 3: Ředění roztoků a naměřené hodnoty absorbance pro albumin a pankreatin

	[mg/ml]	[ml]		[mg/ml]	albumin	pankreatin
	C _{stand.}	V _{stand.}	V _{voda}	c	A	A
1	3	0,5	2,5	0,50	0,091	0,014
2		1,0	2,0	1,00	0,2125	-
3		1,5	1,5	1,50	0,325	0,069
4		2,0	1,0	2,00	0,4335	-
5		2,5	0,5	2,50	0,557	0,115
6		3,0	0,0	3,00	0,705	0,131



Graf 1: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 550 nm

V grafu je uvedena regresní přímka, která udává závislost koncentrace albuminu na absorbanci, která je popsána rovnicí: $y = 0,225x$.



Graf 2: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 550 nm

Pravděpodobně v důsledku omezené rozpustnosti pankreatinu došlo k fluktuaci, a tudíž nebylo možné některé body zahrnout do kalibrační křivky.

Enzym trypsin nebylo možné touto metodou stanovit.

5.1.2 Hartree – Lowryho metoda

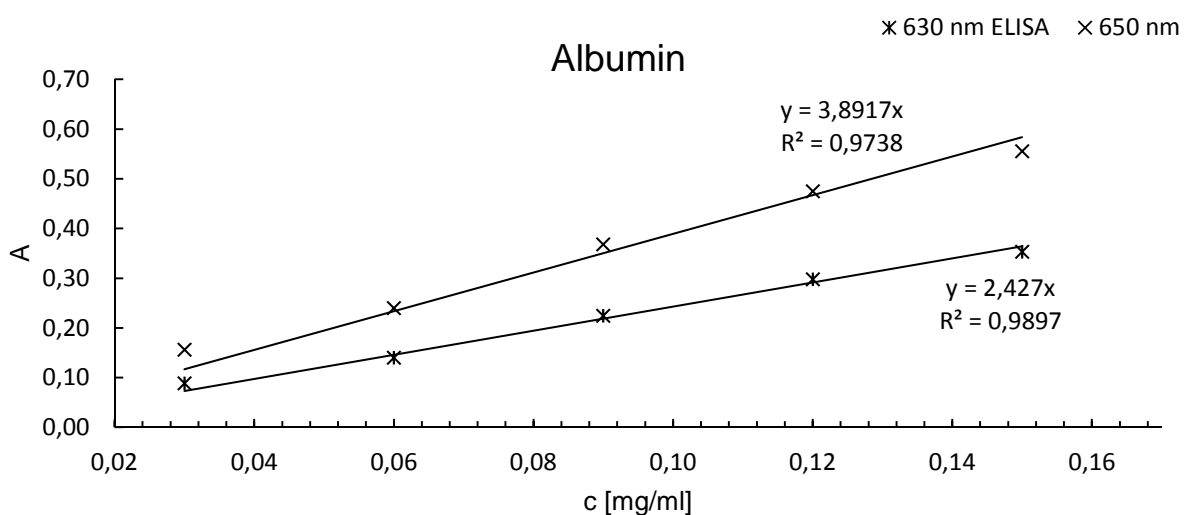
Tato metoda byla vyzkoušena pomocí Nanophotometru i ELISA reader na albuminu, trypsinu a pankreatinu. Opět jak u Biuretové metody jsou kalibrační křivky závislé na lineárně se zvyšující koncentraci při určité absorbanci. U nanophotometru je absorbance při 650 nm, u ELISA readeru při 630 nm. Obě koncovky byly vzájemně porovnány.

Tab. 4: Ředění roztoků pro albumin, trypsin a pankreatin

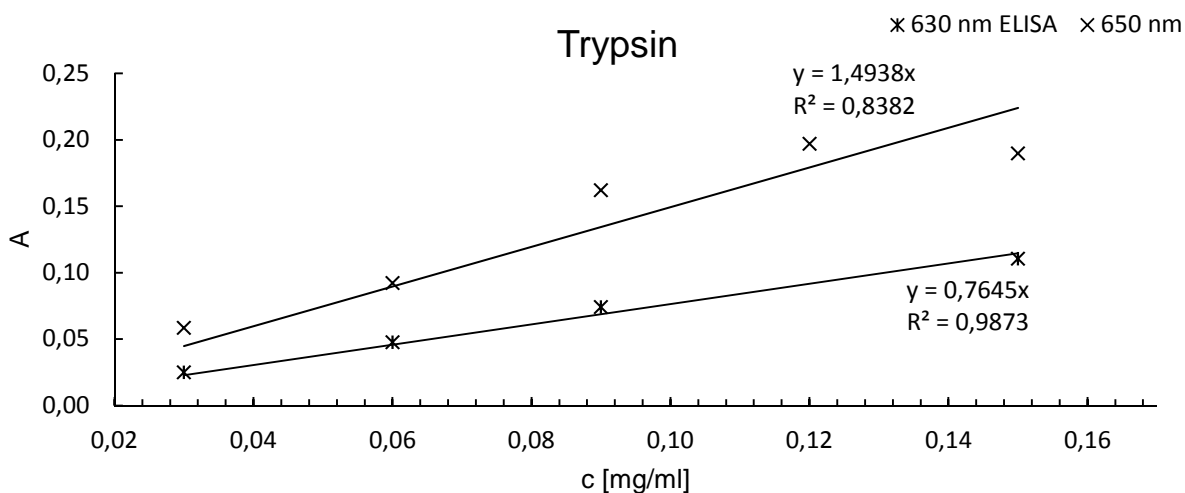
	[mg/ml]	[ml]	[mg/ml]	[-]
	C _{stand.}	V _{stand.}	V _{voda}	C _{vz}
1	0,3	0,1	0,9	0,03
2		0,2	0,8	0,06
3		0,3	0,7	0,09
4		0,4	0,6	0,12
5		0,5	0,5	0,15

Tab. 5: Naměřené hodnoty absorbance při různé koncentraci pro nanophotometr a ELISA readeru

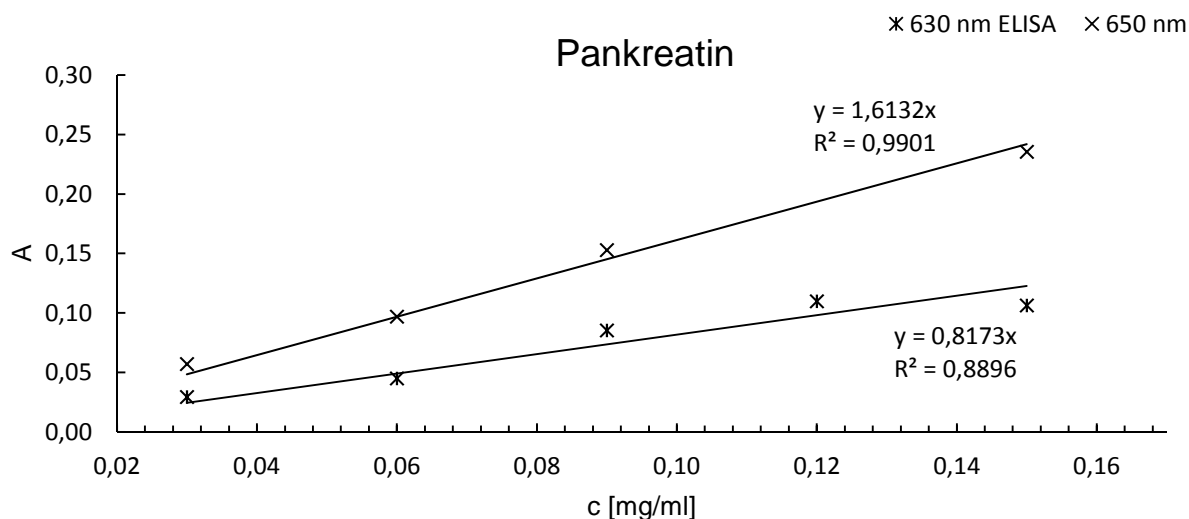
Nanophotometr x ELISA READER	1	2	3	4	5
albumin c[mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0890	0,1405	0,2250	0,2980	0,3535
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,1563	0,2400	0,3685	0,4755	0,5555
trypsin c [mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0250	0,0475	0,0740	-	0,1105
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,0585	0,0920	0,1620	0,1970	0,1897
pankreatin c [mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0295	0,0450	0,0855	0,1100	0,1065
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,0570	0,0970	0,1530	-	0,2355



Graf 3: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace albuminu na absorbanci při 650 nm na nanophotometru a při 630 nm na ELISA readeru



Graf 4: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace trypsinu na absorbanci při 650 nm na nanophotometru a při 630 nm na ELISA readeru



Graf 5: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace pankreatinu na absorbanci při 650 nm na nanofotometru a při 630 nm na ELISA readeru

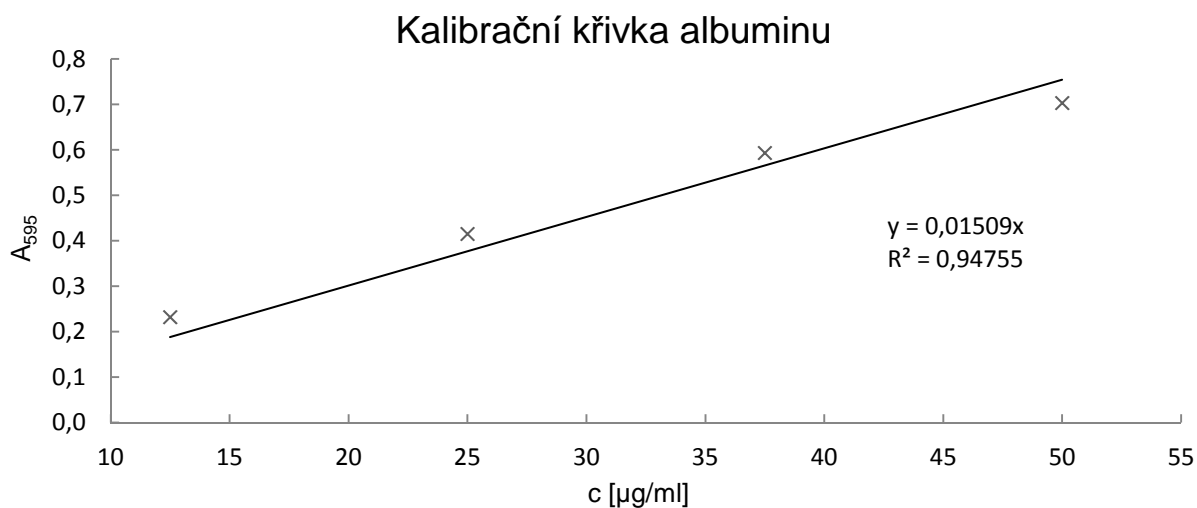
Jelikož ELISA reader nemá možnost měřit absorbanci vzorku při 650 nm, kde má protein při H-L metodě absorpční maximum, musela se absorbance změřit při 630 nm, proto má regresní přímka ELISA readeru znatelně menší směrnici a tedy i citlivost než u nanofotometru. Na druhou stranu je použití ELISA readeru výhodou při analýze velkého množství vzorků.

5.1.3 Bradfordova metoda

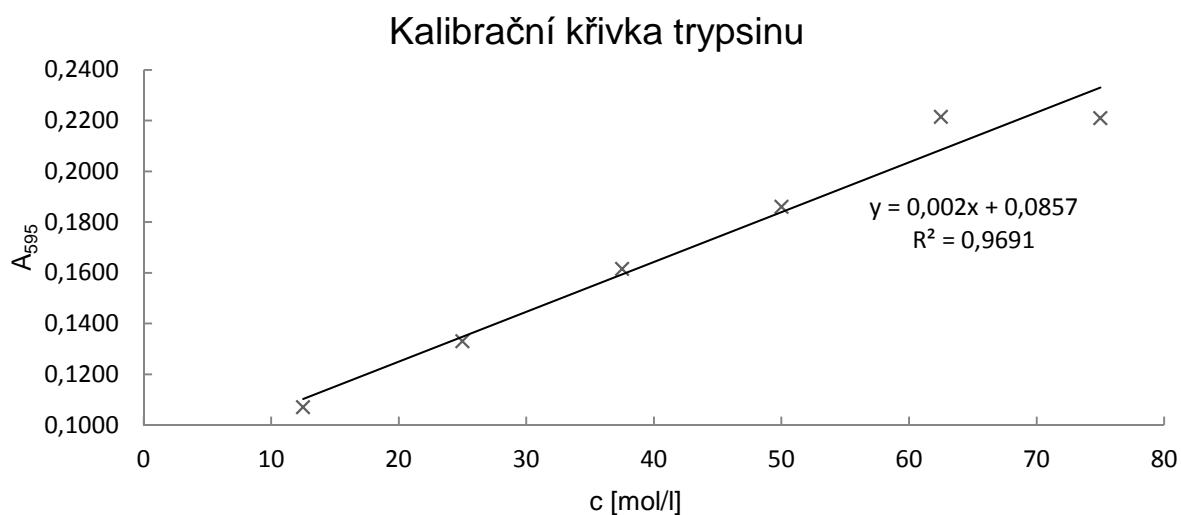
Stejně jako v předchozích případech byla tato metoda použita pro albumin, trypsin i pankreatin. Absorbční maximum je u této metody 595 nm.

Tab. 6: Ředění roztoků a naměřené hodnoty absorbance pro albumin, trypsin a pankreatin

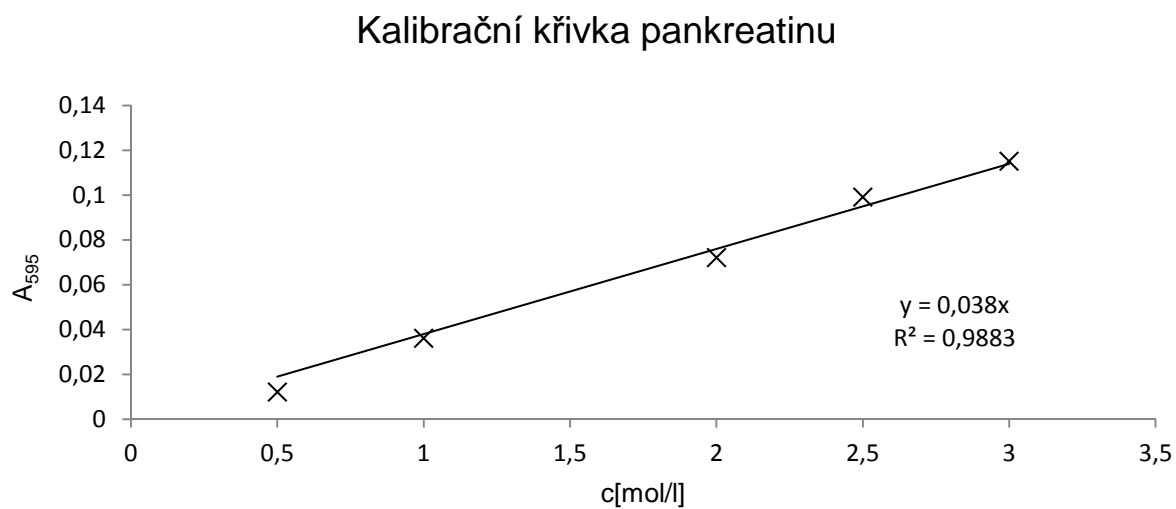
	[mg/ml]	[ml]		[μg/ml]	albumin	trypsin	pankreatin
	$C_{\text{stand.}}$	$V_{\text{stand.}}$	V_{voda}	c	A_{595}	A_{595}	A_{595}
1	0,25	0,05	0,95	12,5	0,2323	0,1070	0,012
2		0,1	0,9	25	0,4157	0,1330	0,036
3		0,15	0,85	37,5	0,5933	0,1615	-
4		0,2	0,8	50	0,7037	0,1860	0,072
5		0,25	0,75	62,5	-	0,2215	0,099
6		0,3	0,7	75	-	0,2210	0,115



Graf 6: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 595 nm



Graf 7: Kalibrační závislost koncentrace trypsinu na absorbanci při 595 nm



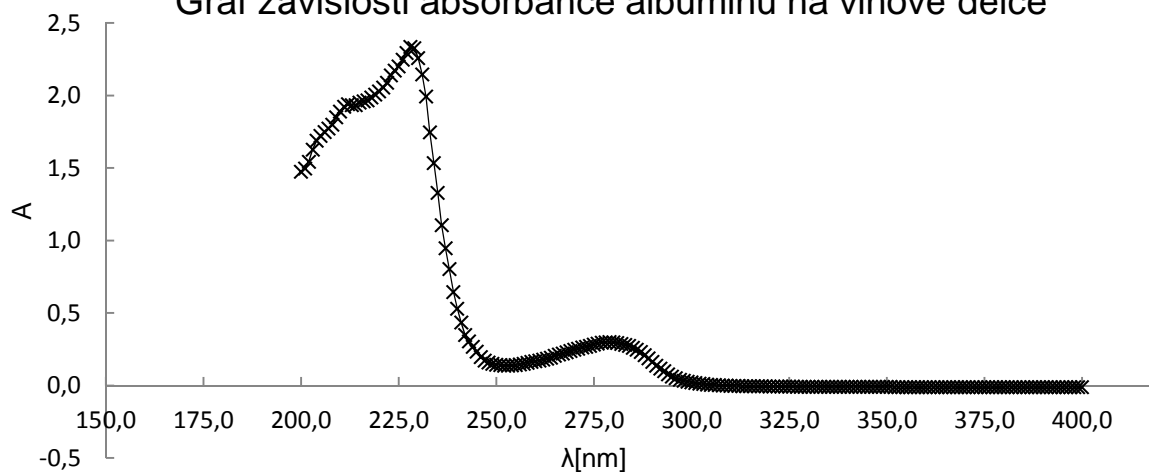
Graf 8: Kalibrační závislost koncentrace pankreatinu na absorbanci při 595 nm

U kalibrační křivky pankreatinu u došlo u jedné hodnoty ke fluktuaci, tato hodnota tedy nebyla zahrnuta do grafu.

5.2 Absorpční spektra vybraných proteinů

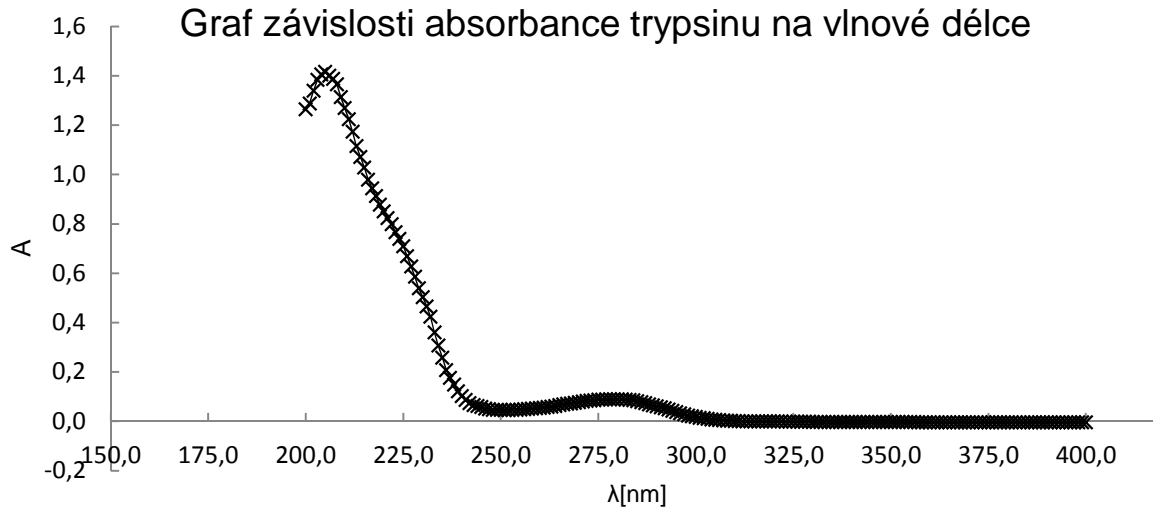
UV profil albuminu, trypsinu a pankreatinu od 150 nm do 400 nm.

Graf závislosti absorbance albuminu na vlnové délce

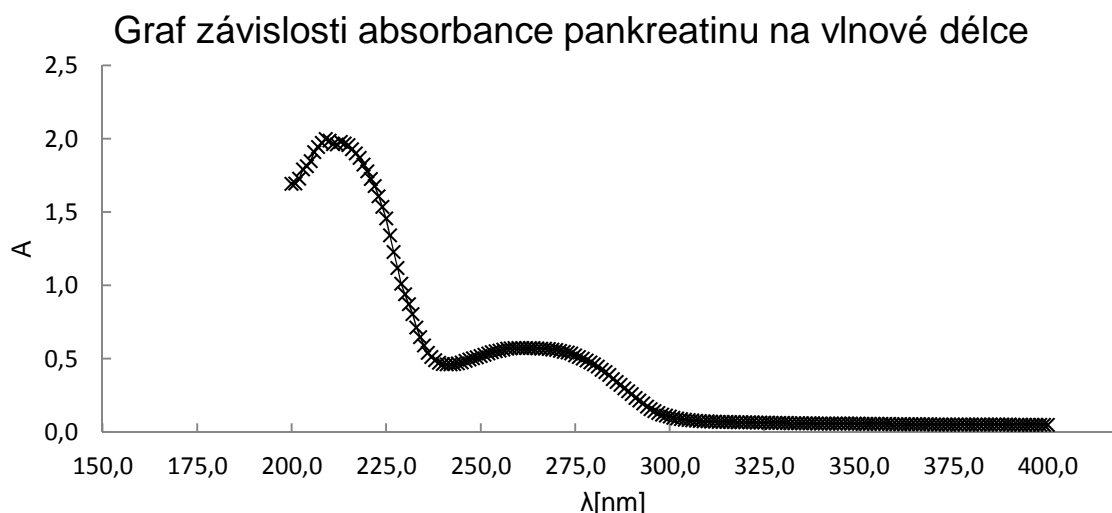


Graf 9: Absorpční spektrum albuminu v UV oblasti

Graf závislosti absorbance trypsinu na vlnové délce



Graf 10: Absorpční spektrum trypsinu v UV oblasti

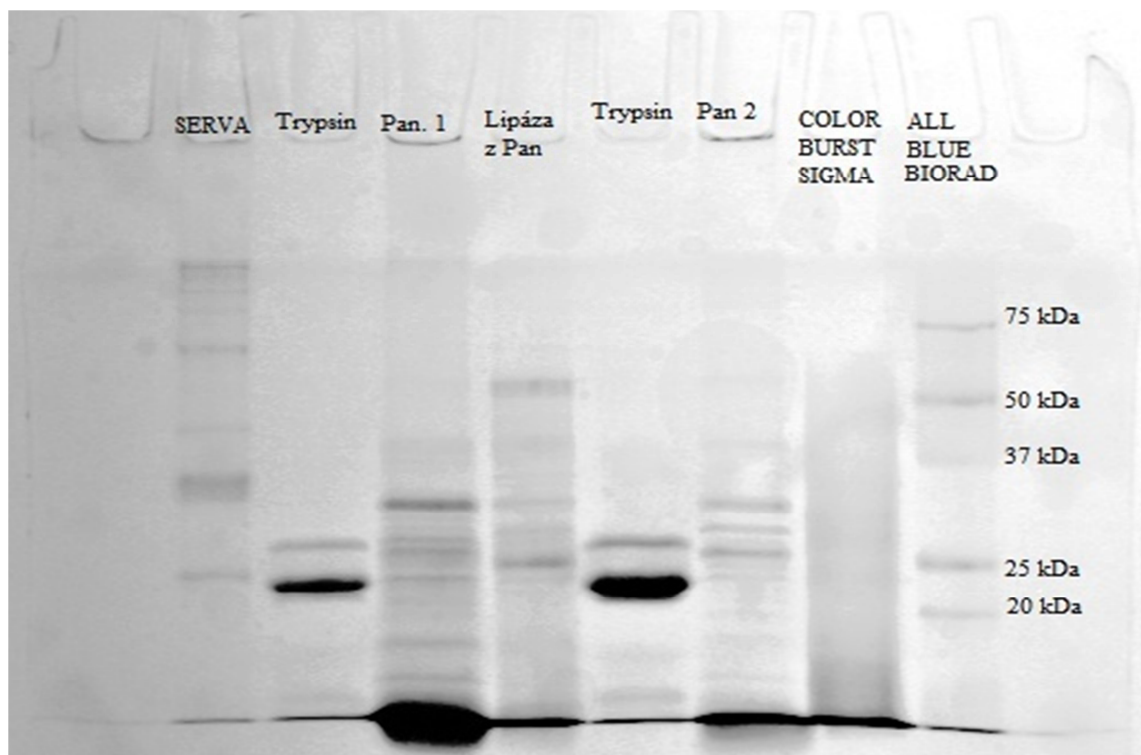


Graf 11: Absorpční spektrum pankreatinu v UV oblasti

Z výsledků je patrné, že jednotlivé vzorky se od sebe příliš neliší, první absorpční maximum je okolo 205 nm, kde absorbují peptidické vazby, při druhém maximu absorpce aromatických aminokyselin se vlnová délka pohybovala v rozmezí okolo 270-280 nm.

5.3 Výsledky stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy

Elektroforéza byla provedena v diskontinuálním provedení, kdy jako zaostřovací gel byl použit gel o koncentraci 7%, separační gel pak měl koncentraci 14% akrylamidu.



Obr. 12: PAGE-SDS s popisky látek a velikostí standardu.

Z obr. 12 je zřejmé, že pankreatin obsahuje řadu složek velikostně v rozmezí od cca 10 kDa po 37 kDa. U vzorku Pan 2 je navíc patrná zóna odpovídající molekulové hmotnosti

cca 50 kDa, která je také patrná u pankreatické lipázy. Molekulové hmotnosti pankreatických lipáz se podle některých pramenů pohybuje okolo 51 kDa [29], jiné pak uvádějí hodnotu 59 kDa [30]. Je tedy pravděpodobné, že právě zóna odpovídající velikosti 50 kDa přísluší právě pankreatické lipáze. Také enzym trypsin (23 kDa) je ve vzorku pankreatinu jasně patrný.

5.4 Výsledky stanovení enzymových aktivit pankreatinu v různém pH

5.4.1 Proteázová aktivita pankreatinu

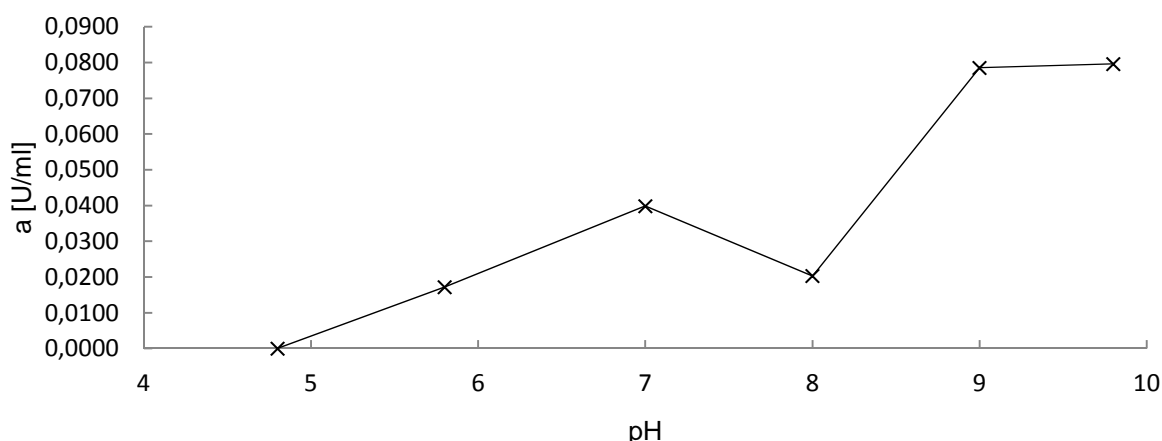
Tato metoda byla provedena pomocí dvou odlišných substrátů, a to s azokaseinem a poté s albuminem.

Proteázová aktivita byla následně vypočítána dle vzorce $a = \frac{A}{t} \cdot 10$, kde A je absorbance, t je počet minut inkubace v termostatu a 10 je přepočet 0,1 ml na 1 ml.

Tab 7:Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu na 1ml

AZOKASEIN					
[-]					[U/ml]
pH	A ₄₄₀			Průměr	$\frac{A}{t} \cdot 10$
4,8	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
5,8	0,067	0,1	0,065	0,0773	0,0172
7	0,168	0,177	0,193	0,1793	0,0399
8	0,108	0,087	0,079	0,0913	0,0203
9	0,351	0,366	0,343	0,3533	0,0785
9,8	0,363	0,346	0,366	0,3583	0,0796

Graf závislosti proteázové aktivity na pH



Graf 12: pH profil proteolytické aktivity pankreatinu se substrátem azokaseinem

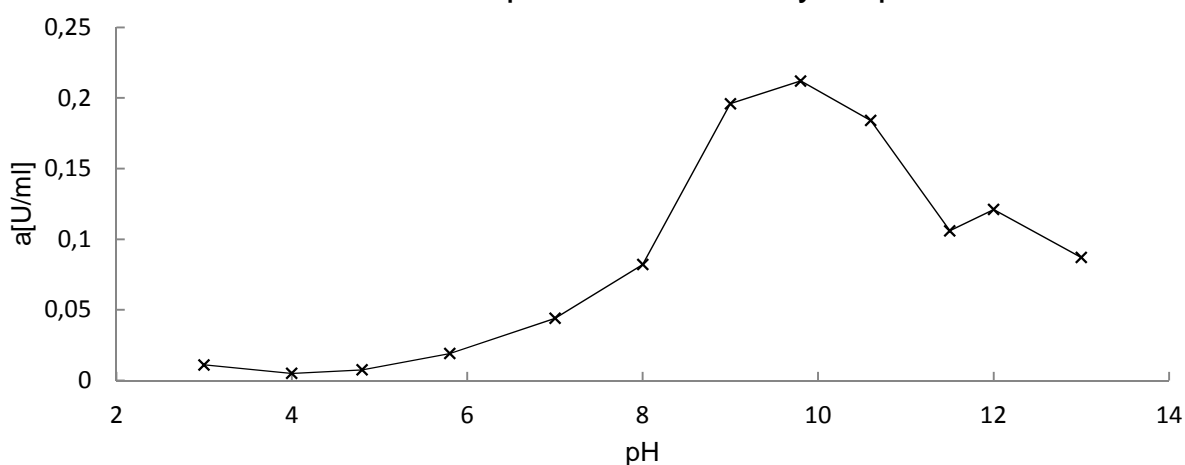
Výsledky tohoto experimentu byly pravděpodobně ovlivněny tou skutečností, že intenzita zabarvení azokaseinu je silně závislá na pH, přičemž roste s vyšší alkalitou prostředí. Proto

byl v dalším experimentu změněn substrát z azokaseinu na albumin, který nemění barvu v závislosti na pH a navíc je také lépe rozpustný v kyselém prostředí.

Tab.8: Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu na 1ml

albumin:		[U/ml]
pH	A	$\frac{A}{t} \cdot 10$
3	0,011	0,0024
4	0,005	0,0011
4,8	0,0075	0,0017
5,8	0,019	0,0042
7	0,044	0,0098
8	0,082	0,0182
9	0,196	0,0436
9,8	0,212	0,0471
10,6	0,184	0,0409
11,5	0,106	0,0236
12	0,121	0,0269
13	0,087	0,0193

Graf závislosti proteázové aktivity na pH



Graf 13: pH profil proteolytické aktivity pankreatinu se substrátem albuminem

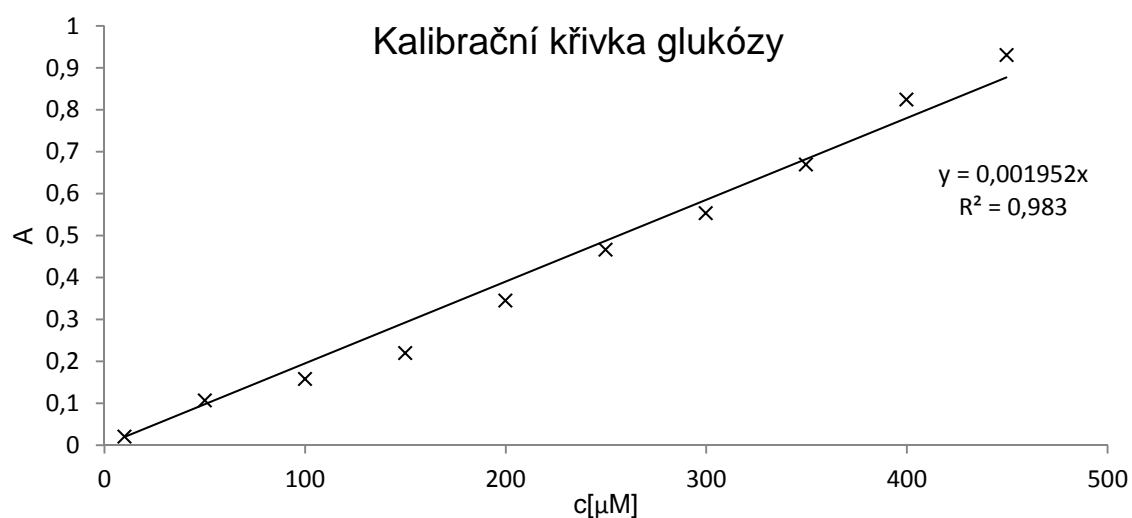
Je zjevné, že v případě použití jiného substrátu, v tomto případě albuminu je pH profil čitelnější a jasně z něj vyplývá, že pH optimum je okolo pH 10. V případě azokaseinu nelze věrohodně určit optimální pH, při kterém má enzym nejvyšší aktivitu.

5.4.2 Amylázová aktivita pankreatinu

Amylázová aktivita pankreatinu se určovala pomocí substrátu, kterým byl v našem případě 1% škrob. Pro výpočet amylázové aktivity je potřeba znát kalibrační křivku glukózy, ze které byla vypočítána koncentrace substrátu ($y=0,001952 \cdot x$), která se přepočítala na rozdíl látkového množství pomocí vzorce $n=c \cdot V$ a tato hodnota byla vydělena dobou, po kterou byla měřena absorbance a faktorem přepočítávajícím aktivitu na aktivitu na ml.

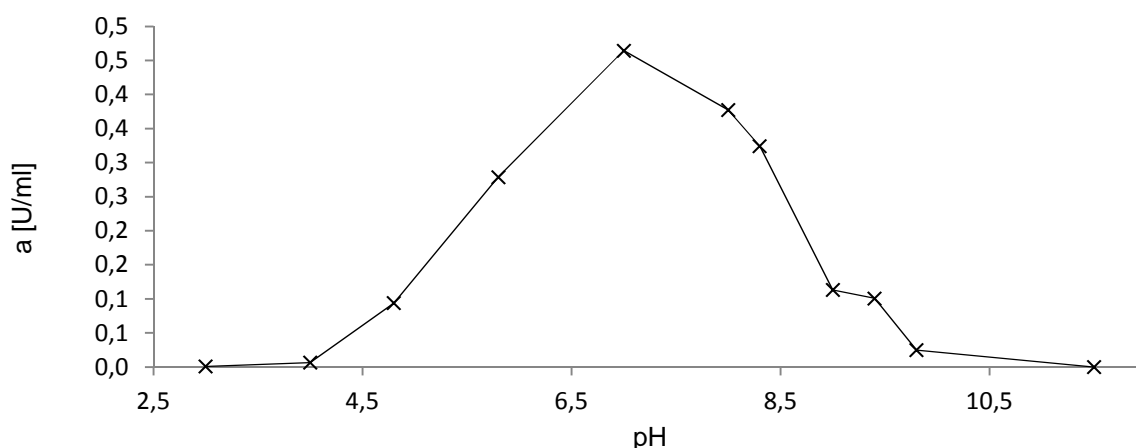
Tab. 9: Data pro kalibrační křivku glukózy

c (g/l)	c (μmol/l)	A 720 nm
0,0018	9,9913963	0,021
0,009	49,956981	0,107
0,018	99,913963	0,158
0,027	149,87094	0,22
0,036	199,82793	0,345
0,045	249,78491	0,467
0,054	299,74189	0,554
0,063	349,69887	0,67
0,072	399,65585	0,825
0,081	449,61283	0,931

**Graf 14:** Kalibrační závislost absorbance na koncentraci glukózy v roztoku**Tab. 10:** Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu

	[-]			[U/ml]
pH:	A	A	průměr	a
3	0,002	0,000	0,001	0,0009
4	0,015	0,000	0,008	0,0064
4,8	0,177	0,043	0,110	0,0939
5,8	0,191	0,462	0,327	0,2788
7	0,583	0,505	0,544	0,4645
8	0,438	0,446	0,442	0,3774
8,3	0,392	0,368	0,380	0,3245
9	0,189	0,076	0,133	0,1131
9,4	0,119	0,117	0,118	0,1008
9,8	0,000	0,058	0,029	0,0248
11,5	0,000	0,000	0,000	0,0000

Graf závislosti amylázové aktivity na pH



Graf 15: pH profil pankreatinu se substrátem škrob

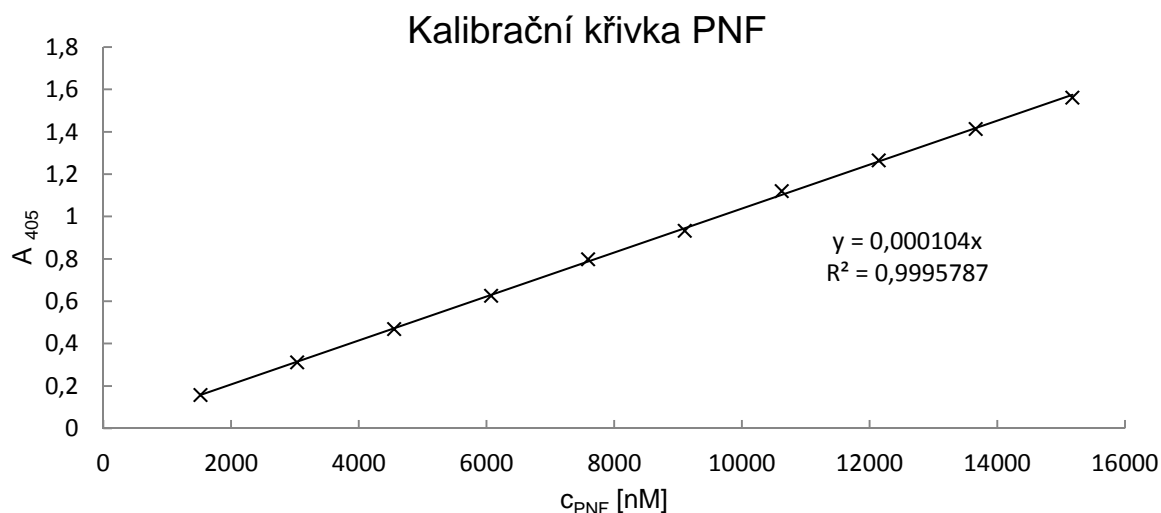
Z grafu je patrné, že amylázová aktivita má jasné maximum v pH=7.

5.4.3 Lipázová aktivita pankreatinu

Lipázová aktivita byla měřena pomocí přístroje ELISA reader, za použití substrátu nitrofenylpalmitátu, kde bylo zapotřebí nejprve změřit kalibrační křivku, která je potřebná k následnému výpočtu lipázové aktivity. Výpočet lipázové aktivity byl následující: Z rozdílu absorbancí byla vypočítána změna koncentrace substrátu ($y=0,000104 \cdot x$), která se přepočítala na rozdíl látkového množství pomocí vzorce $n=c \cdot V$ a tato hodnota byla vydělena dobou, po kterou byla měřena absorbance a tato hodnota přepočítána na 1 ml roztoku.

Tab. 11: Hodnoty kalibrační křivky PNF

	[ul]		[mM]	[-]	[nM]
	PNF	pufr	c	A_{405}	c
1	25	255	0,015	0,158	1517,9
2	50	230	0,030	0,313	3035,7
3	75	205	0,046	0,469	4553,6
4	100	180	0,061	0,627	6071,4
5	125	155	0,076	0,799	7589,3
6	150	130	0,091	0,933	9107,1
7	175	105	0,106	1,121	10625,0
8	200	80	0,121	1,266	12142,9
9	225	55	0,137	1,414	13660,7
10	250	30	0,152	1,562	15178,6



Graf 16: Kalibrační závislost koncentrace PNF na absorbanci při 405 nm

Tab. 12-13: Hodnoty absorbancí pro všechny pH

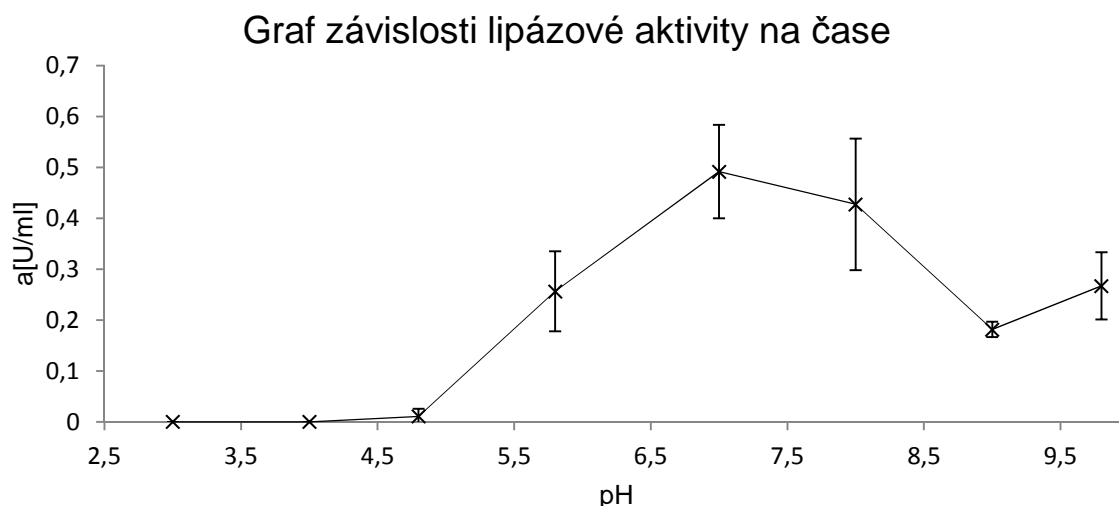
t [min]	A u pH = 3			A u pH = 4			A u pH = 4,8			A u pH = 5,8		
0	0,528	0,49	0,575	0,541	0,549	0,58	0,626	0,666	0,659	0,618	0,608	0,731
1	0,541	0,495	0,576	0,544	0,552	0,586	0,629	0,67	0,654	0,617	0,604	0,731
2	0,539	0,498	0,581	0,548	0,555	0,589	0,628	0,672	0,652	0,615	0,603	0,731
3	0,533	0,505	0,585	0,552	0,557	0,591	0,627	0,672	0,651	0,613	0,602	0,732

t [min]	A u pH = 7			A u pH = 8			A u pH = 9			A u pH = 9,8		
0	0,588	0,590	0,199	0,194	0,220	0,358	0,293	0,264	0,497	0,441	0,475	0,637
1	0,592	0,595	0,200	0,196	0,221	0,360	0,295	0,264	0,489	0,445	0,484	0,643
2	0,600	0,602	0,202	0,198	0,222	0,364	0,298	0,267	0,493	0,447	0,492	0,646
3	0,607	0,610	0,204	0,200	0,226	0,369	0,301	0,270	0,501	0,451	0,494	0,648

Tab. 14-15: Výpočet lipázové aktivity pankreatinu

	pH = 3			pH = 4			pH = 4.8			pH = 5.8			pH = 7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΔA	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	0,001	0,011	0,008	0,005	0,019	0,015	0,012
U/ml							0,0000	0,0000	0,0321	0,3526	0,2564	0,1603	0,6090	0,4808	0,3846
Průměr							-	0,0107	-	-	0,2564	-	-	0,4915	-
SMODCH							-	0,0151	-	-	0,0785	-	-	0,0919	-

	pH = 8			pH = 9			pH = 9.8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΔA	0,01	0,019	0,011	0,005	0,006	0,006	0,011	0,008	0,006
U/ml	0,3205	0,6090	0,3526	0,1603	0,1923	0,1923	0,3526	0,2564	0,1923
Průměr	-	0,4274	-	-	0,1816	-	-	0,2671	-
SMODCH	-	0,1291	-	-	0,0151	-	-	0,0659	-



Graf 17: pH profil lipázové aktivity pankreatinu

Lipázová enzymatická aktivita pankreatinu je dle výpočtů a z nich sestrojeného grafu nejvyšší při pH 7. Hodnoty, které vycházely v rozdílu absorbancí záporně, byly počítány jako nulové.

5.5 Stanovení teplotního optima jednotlivých enzymů pankreatinu

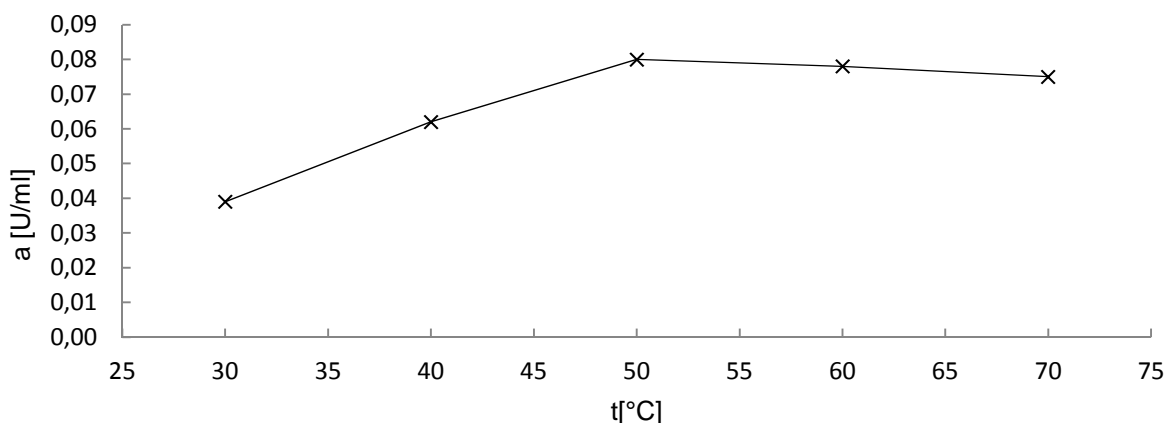
5.5.1 Proteázová aktivita pankreatinu

Byl aplikován stejný postup jako u stanovení teplotní aktivity s různými hodnotami pH s tím rozdílem, že místo rozdílného pH se vzorky temperovaly s různou hodnotou °C od 30 až po 70 °C s krokem 10 °C. Všechny vzorky byly připraveny s pufrům pH = 9,8.

Tab. 16: Naměřená data absorbancí a výpočet enzymových aktivit

[°C]	[-]				[U/ml]
t [°C]	A			Průměr	$\frac{A}{t} \cdot 10$
30	0,178	0,173	-	0,176	0,0390
40	0,285	0,277	-	0,281	0,0620
50	0,366	0,356	-	0,361	0,0800
60	0,355	0,344	0,354	0,351	0,0780
70	0,344	0,341	0,333	0,339	0,0750

Graf závislosti proteázové aktivity na teplotě



Graf 18: Teplotní profil proteázové aktivity pankreatinu

Enzym pankreatin prokazuje nejvyšší proteázovou aktivitu v 50 °C. Klesající tendence enzymové aktivity není tak zřetelná ve vyšších teplotách, lze tedy říci, že má pankreatin téměř konstantní enzymovou aktivitu od 50 °C do 70 °C.

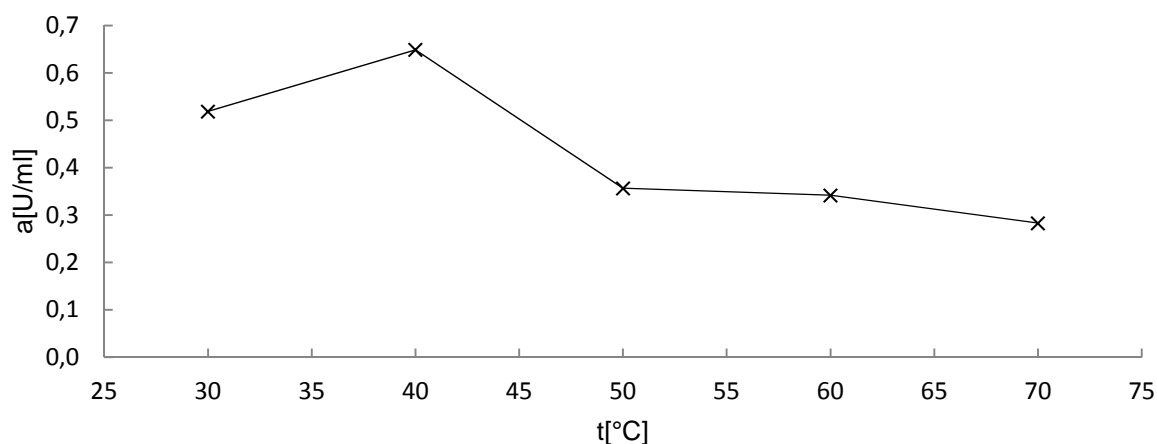
5.5.2 Amylázová aktivita pankreatinu

Teplotní amylázová aktivita pankreatinu byla zjišťována obdobně jako pH profil. Hodnota pH ale bylo v tomto měření konstantní, a to pH 7. Proměnnou složkou byla teplota v rozmezí od 30 – 70 °C.

Tab. 17: Hodnoty teplot a jejich příslušných absorbancí a aktivit

[°C]	[-]					[U/ml]
Teplota:	A	A	A	A	průměr	a
30	0,586	0,629	-	-	0,608	0,5188
40	0,706	0,751	0,789	0,794	0,760	0,6489
50	0,454	0,397	0,426	0,394	0,418	0,3567
60	0,363	0,390	0,416	0,432	0,400	0,3417
70	0,276	0,363	0,308	0,378	0,331	0,2828

Graf závislosti amylázové aktivity na teplotě



Graf 19: Teplotní profil amylázové aktivity pankreatinu

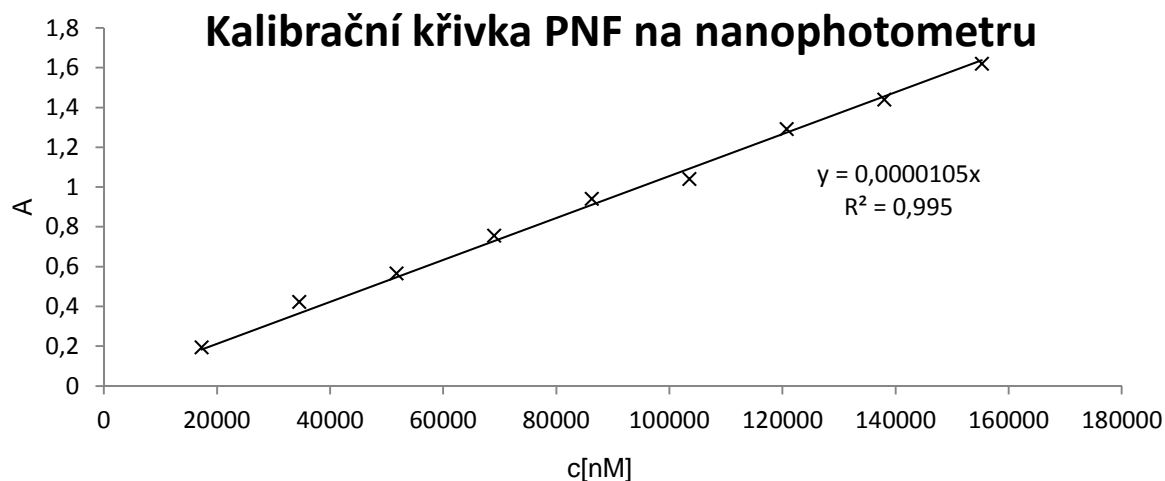
Amylázová aktivita pankreatinu má dle grafu maximum ve 40 °C.

5.5.3 Lipázová aktivita pankreatinu

Lipázová aktivita enzymu byla nejdříve proměřena na přístroji ELISA reader, přístroj ale nedokázal udržet po dobu měření konstantní teplotu, výsledky tedy byly značně zkreslené. K identifikaci lipázové aktivity pankreatinu byl tedy použit nanophotometer. Měření bylo provedeno se vzorky obsahující identický pufr o pH=7 a byly inkubovány při teplotách od 30 – 70 °C po dobu 30 minut. Jelikož se při postupu identifikace lipázové aktivity museli změnit přístroje, bylo nutné na nanophotometru určit kalibrační křivku paranitrofenolu.

Tab. 18: Hodnoty kalibrační křivky PNF

[ml]		[mg/ml]	[µg/ml]	-
V PNF	V pufru	c	c	A
0,1	0,9	0,0024	2,4	0,195
0,2	0,8	0,0048	4,8	0,423
0,3	0,7	0,0072	7,2	0,566
0,4	0,6	0,0096	9,6	0,756
0,5	0,5	0,012	12	0,941
0,6	0,4	0,0144	14,4	1,041
0,7	0,3	0,0168	16,8	1,292
0,8	0,2	0,0192	19,2	1,44
0,9	0,1	0,0216	21,6	1,62

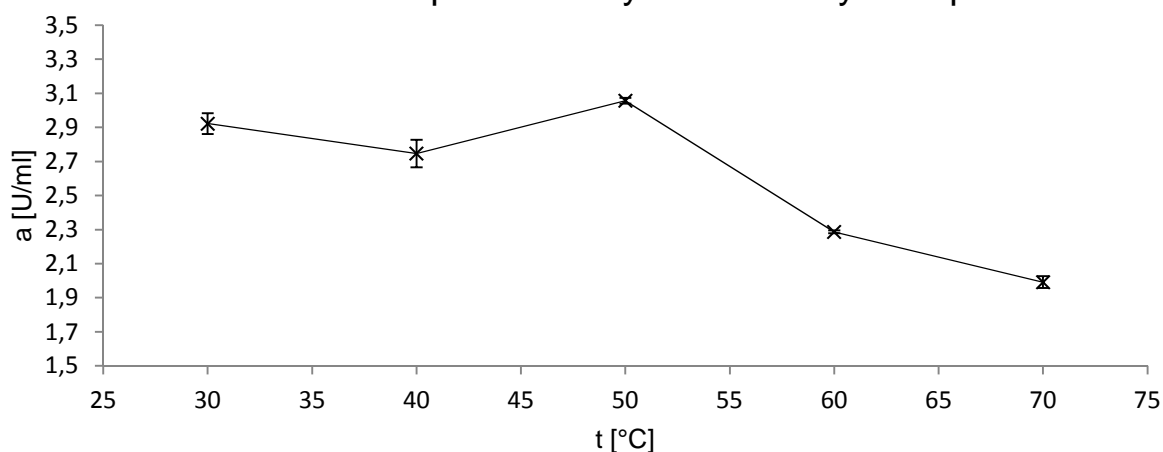


Graf 20: Kalibrační závislost koncentrace PNF na absorbanci při 405 nm

Tab.19: Hodnoty absorbancí pro různé teploty

[°C]	[-]							[U/ml]	[-]
t	A	A	A	A	A	A	průměr	a	SMODCH
30	0,885	0,987	0,84	0,97	-	-	0,921	2,9222	0,0604
40	0,996	0,837	0,814	0,797	0,956	0,791	0,865	2,7466	0,0805
50	0,974	0,929	0,972	0,961	0,982	0,959	0,963	3,0566	0,0170
60	0,73	0,723	0,725	0,703	0,722	0,718	0,720	2,2862	0,0085
70	0,623	0,673	0,637	0,576	-	-	0,627	1,9913	0,0348

Graf závislosti lipázové enzymové aktivity na teplotě



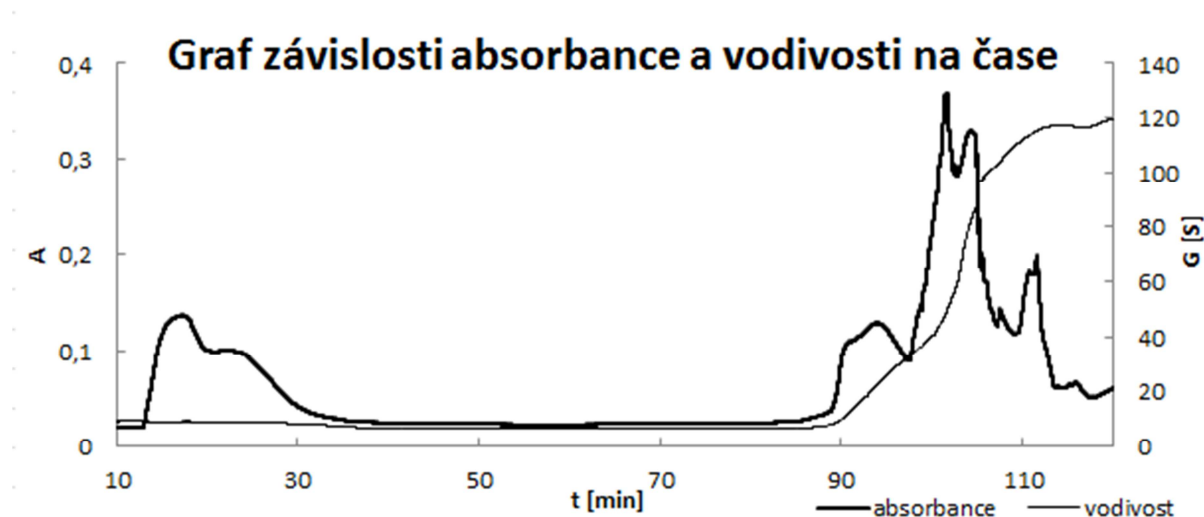
Graf 21: Teplotní profil lipázové aktivity pankreatinu

Z grafu vyplývá, že maximum lipázové aktivity je v 50 °C, optimální hodnoty jsou ale i při teplotách 30 – 50 °C, poté aktivita rapidně klesá.

5.6 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC

5.6.1 Iontoměničová LPLC

Stanovení pomocí LPLC bylo provedeno s puforem o pH 8,3 a s maximální koncentrací pankreatinu, vymývání vzorku bylo postupně prováděno lineárním gradientem pufru o pH 8,3 a 1 M NaCl. Do zkumavek byly odebírány frakce po 3 ml a v nich stanovena aktivita všech tří složek pankreatinu.



Graf 22: Stanovení pankreatinu pomocí iontoměničové LPLC

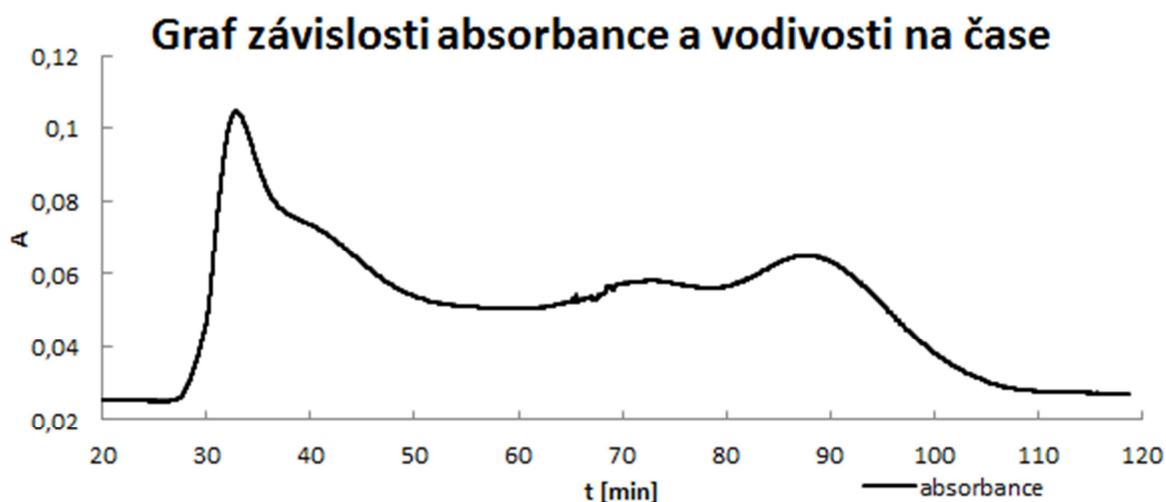
Tab. 20: Data absorbancí a výpočet aktivit pro 3 složky aktivit pankreatinu

Zkumavka [min]	Proteázová aktivita		Amylázová aktivita		Lipázová aktivita	
	A	a [U/ml]	A	a [U/ml]	A	a [U/ml]
odpad	0,178	0,0396	0,154	0,1315	0,007	0,2244
90-96	0,014	0,0031	0,156	0,1332	0,017	0,5449
97-102	0,105	0,0233	0,117	0,0999	0,010	0,3205
103-108	0,199	0,0442	0,096	0,0820	0,021	0,6731
109-115	0,328	0,0729	zákal	-	0,008	0,2564
116-121	0,158	0,0351	zákal	-	0,010	0,3205
122-127	0,055	0,0122	zákal	-	0,007	0,2244

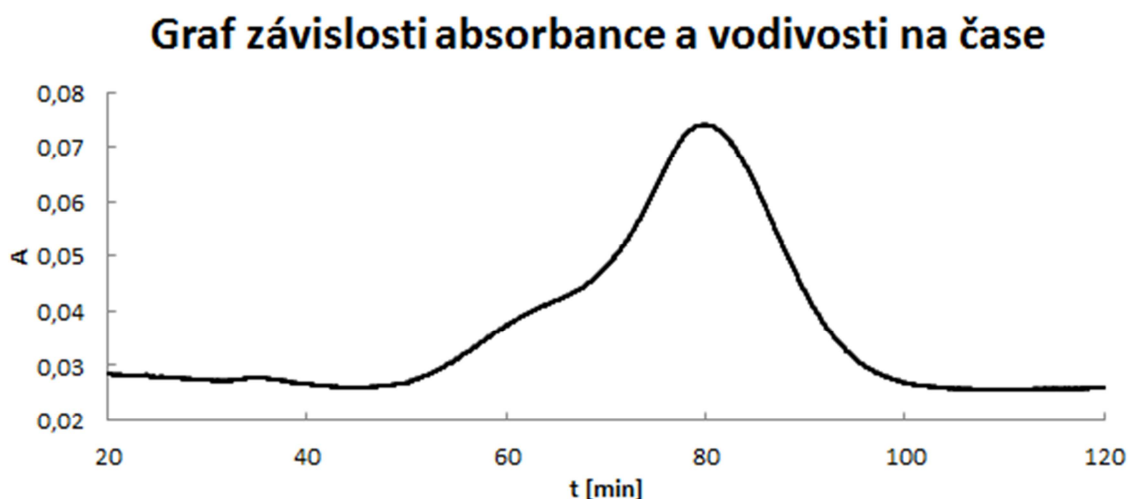
Z analýzy aktivit jednotlivých složek pankreatinu ve frakcích je patrné, že nedošlo k dobré separaci jednotlivých enzymů, např. velká část proteolytických enzymů se na koloně vůbec nezadržovala, podobně tomu bylo i u amyláz. Pro lepší separaci by bylo nezbytné optimalizovat sorpční podmínky (pravděpodobně zvýšit pH pufru) a také optimalizovat podmínky eluce.

5.6.2 Gelová filtrace LPLC

Gelová filtrace byla provedena s puforem taktéž o pH = 8,3. Graf byl porovnán se standardem BIO-RAD 151-1901 s komponenty Thyroglobulin o molekulární hmotnosti 670 kDa, γ -globulin o 158 kDa, ovalbumin o 44 kDa, myoglobin o 17 kDa a vitamin B₁₂ o 1,35 kDa [28].



Graf 23: Analýza standardu pomocí gelové filtrace



Graf 24: Analýza pankreatinu pomocí gelové filtrace

Z chromatografu standardu lze vyčíst, že se ve 30. minutě vyplavily molekuly o velikosti 670 a 158 kDa, které byly příliš velké a na použitém chromatografickém médiu se neseperoaly, ve 40. minutě se vyplavily molekuly o hmotnosti 44 kDa, poté se postupně vyplavovaly v 70. minutě molekuly o hmotnosti 17 kDa a nakonec v 90. minutě i vitamin B₁₂ o velikosti 1,35 kDa. Vzorek pankreatinu tedy obsahoval minimum molekul o velikosti nad 50 kDa, více molekul bylo o molekulové hmotnosti cca 20 kDa a největší zastoupení molekul je o velikosti cca 2 kDa. Tyto výsledky jsou konzistentní s analýzou velikostí jednotlivých proteinů pankreatinu pomocí PAGE-SDS.

5.7 Enkapsulace do liposomů

Testovány byly enkapsulace pankreatinu (0,5 mg/ml) do liposomů připravených v prostředí obsahující koncentrace lipidických složek. Bylo stanovováno enkapsulované množství enzymu, proteázová aktivita jako marker nativity enzymu, distribuce velikosti částic, zeta potenciál.

5.7.1 Výsledky stanovení množství enkapsulovaného pankreatinu

Vzorek pankreatinu o koncentraci 0,5 mg/ml byl enkapsulován do různých koncentrací (1,25; 5; 10 a 25 mg/ml) lecitinu s cholesterolem v poměru 9:1. Pomocí H-L metody rozdílem absorbancí vzorku před a po enkapsulaci byla zjištěna koncentrace enkapsulovaného množství ve vzorcích. Koncentrace pankreatinu byla vypočtena z kalibrační křivky s regresní přímkou $y=1,613x$.

Tab. 21: Naměřené hodnoty před enkapsulací

[mg/20 ml]	[mg/ml]	[-]	[mg/ml]
c liposomů	c liposomů	A pan.	c pan.
25	1,25	0,376	0,466
100	5	0,376	
200	10	0,376	
500	25	0,376	

Tab. 22: Naměřené hodnoty po enkapsulaci

[mg/20 ml]	[-]	[mg/ml]		[%]
c liposomů	A po enkaps.	c po enkaps.	Δc	Enkaps. účinnost
25	0,373	0,4625	0,0037	0,80
100	0,337	0,4179	0,0484	2,66
200	0,366	0,4538	0,0124	7,7
500	0,13	0,1612	0,3050	65,43

S rostoucí koncentrací liposomů se zvyšuje i enkapsulační účinnost. V nejvyšší koncentraci 25 mg/ml tedy byla naměřena maximální enkapsulační účinnost.

5.7.2 Výsledky stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu

Cílem experimentu bylo potvrdit, jestli je možné enkapsulovat naivní protein do struktury liposomu a jestli pak liposomy enkapsulované enzymy spontánně uvolňují. Jako zástupce celkové enzymové aktivity pankreatinu byla vybrána aktivita proteázová. Postup byl identický jako v předchozích případech určování proteázové aktivity. Jako ideální podmínky pro pankreatin bylo zvoleno pH 9,8 a teplota 50 °C.

Liposomy byly rozsuspendovány v pufru o pH 9,8 a inkubovány po dobu 1 hodiny při 50 °C. Poté byly opět stočeny a v supernatantu byla stanovena proteázová aktivita identicky jako v kapitolách 4.5.1 a 4.6.1, pro inkubaci byla zvolena optimální teplota 50 °C. Enzymová aktivita byla ale nulová. Vysvětlení nulové aktivity může být dvojitě. Za prvé mohlo dojít k inaktivaci enzymu denaturací jeho funkční struktury při enkapsulaci ultrazvukem, nebo membrána, ve které je enzym enkapsulován ho zadržuje a zpětně neuvolňuje do okolí.

5.7.2.1 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí

Jako indikátor nativního stavu enkapsulovaného enzymu byla vybrána proteázová aktivita. Nejprve byla proměřena proteázová aktivita zásobního roztoku před a po vystavení vzorku ultrazvuku. Poté byla stanovena i proteázová aktivita enzymů ze sedimentu, který obsahoval enkapsulované molekuly enzymu uvolněné z liposomů pomocí fosfolipázy D ze zelí i proteolytická aktivita extraktu ze zelí. Tyto dvě hodnoty absorbancí byly od sebe odečteny a výsledné hodnoty porovnány s aktivitou zásobního roztoku pankreatinu.

Tab. 23: Hodnoty absorbancí a enzymových aktivit pankreatinu

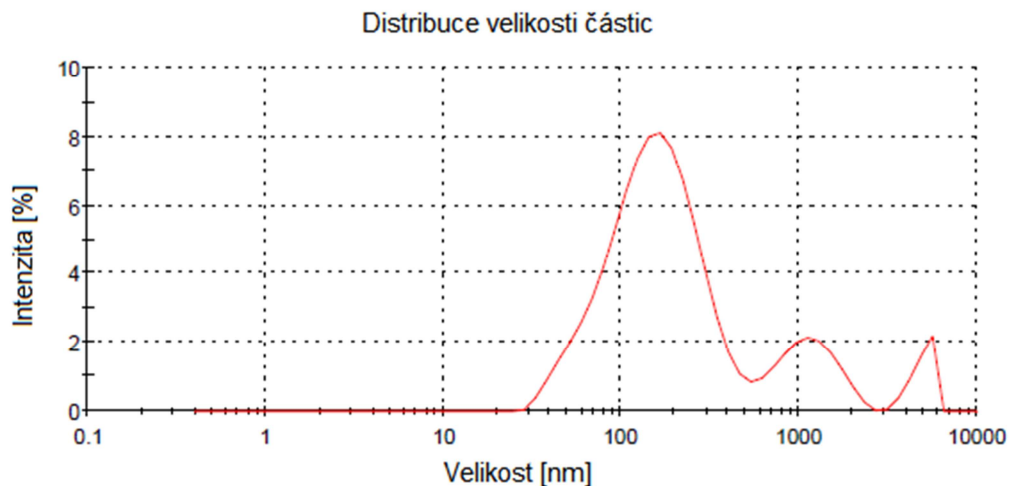
	[-]				[U/t]
	A ₂₈₀	A ₂₈₀	A ₂₈₀	Průměr	aktivita
Před ultrazvukem	0,410	0,486	0,388	0,428	0,071
Po ultrazvuku	0,637	0,600	0,599	0,612	0,102
Extrakt ze zelí.	0,730	0,720	0,735	0,728	0,121
Liposomy vystavené působení extraktu ze zelí	1,008	0,909	0,823	0,913	0,152
Samotný enzym	0,278	0,189	0,088	0,185	0,031

Z výsledků je patrné, že proteázová aktivita pankreatinu se po ultrazvuku zvýšila, enzym se tedy nedenaturoval, naopak došlo pravděpodobně díky lepší dispergaci enzymu k navýšení jeho aktivity. Aplikace fosfolipázy potvrdila, že do struktury liposomů se podařilo uzavřít nativní enzym, který se uvolnil právě jejím působením. Po odečtení hodnot proteolytické aktivity extraktu ze zelí od liposomů vystaveným působení zelného extraktu je aktivita téměř poloviční jako aktivita pankreatinu před ultrazvukem a třetinová jako po ultrazvuku.

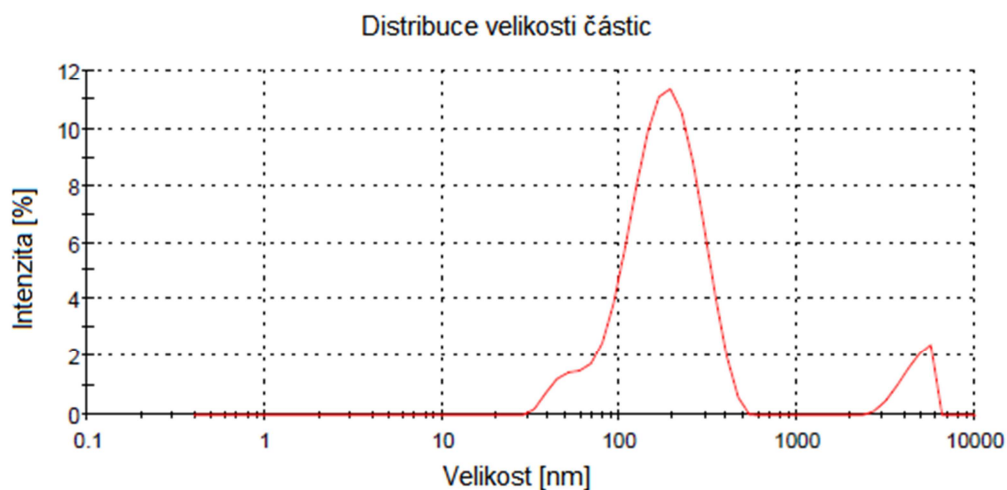
5.7.3 Výsledky stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciál

Výsledky v sobě skýtají dvě měření, kdy u druhého vzorku byla jako další krok v postupu sjednocována velikost částic pod 100 nm.

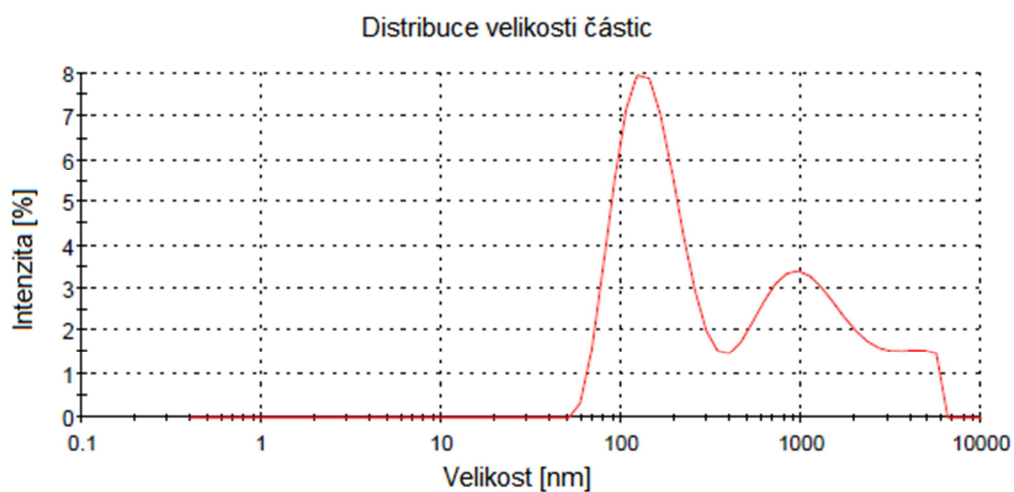
Porovnání výsledků DLS s membránovým extrudérem bez něj.



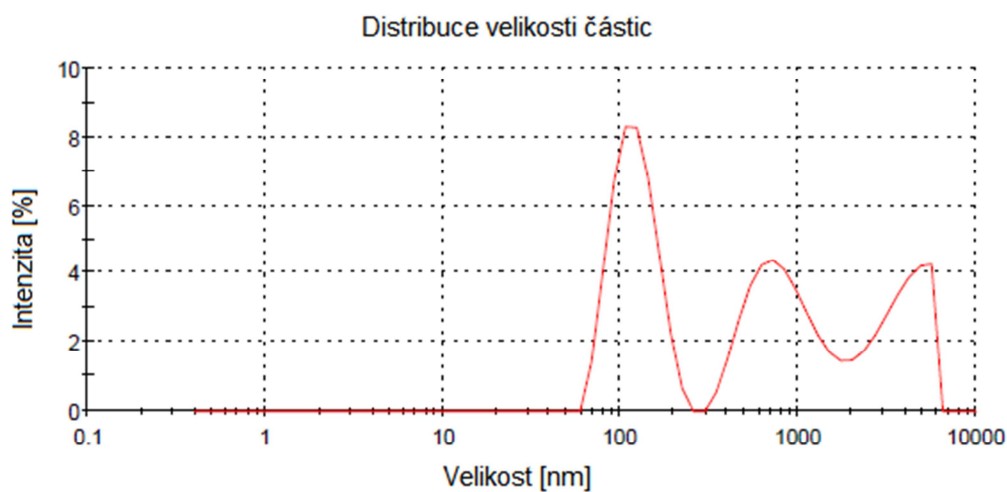
Obr. 13: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml



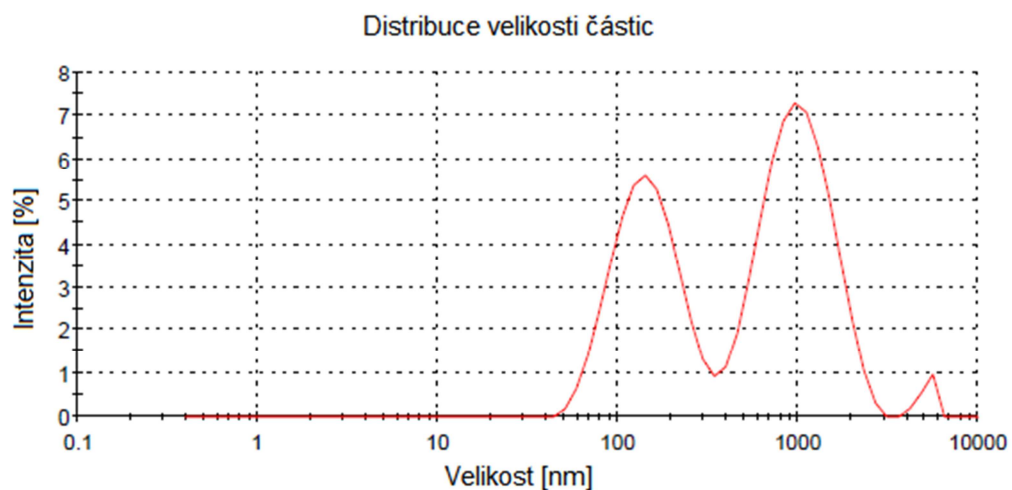
Obr. 14: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



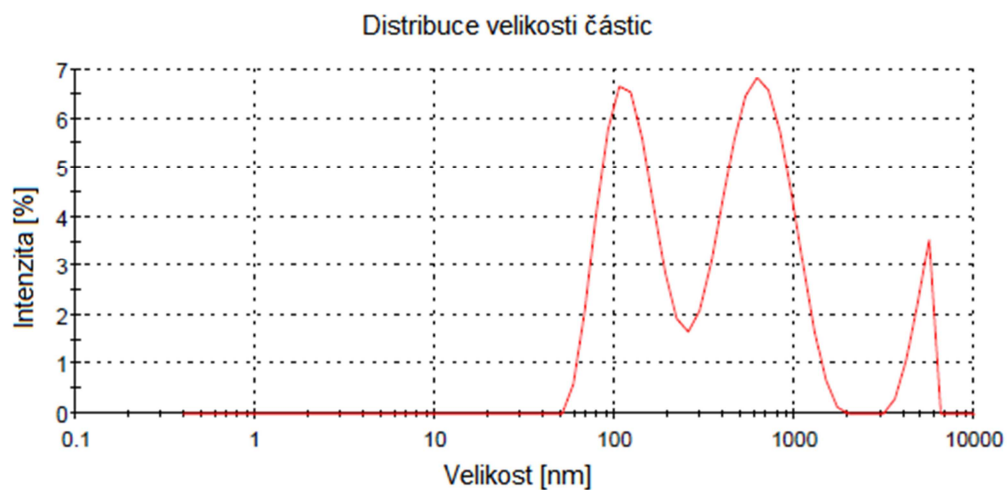
Obr. 15: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml



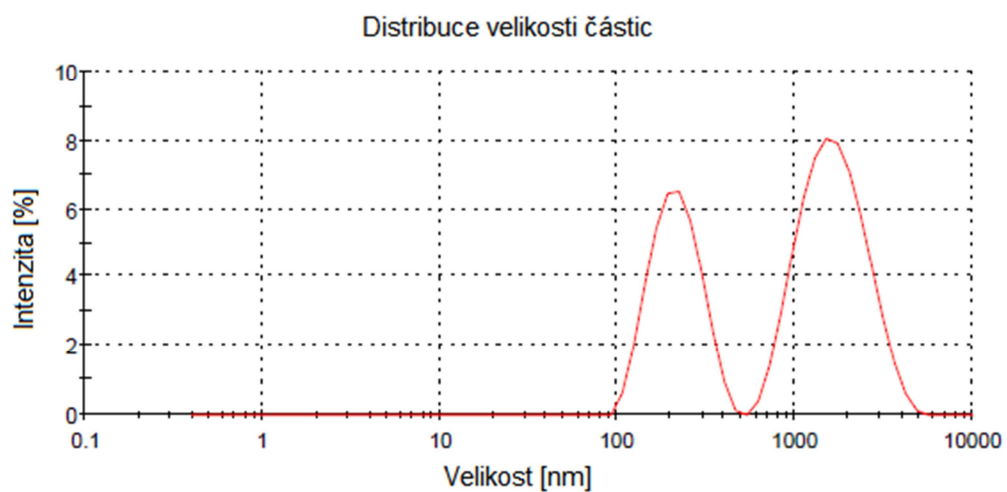
Obr. 16: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



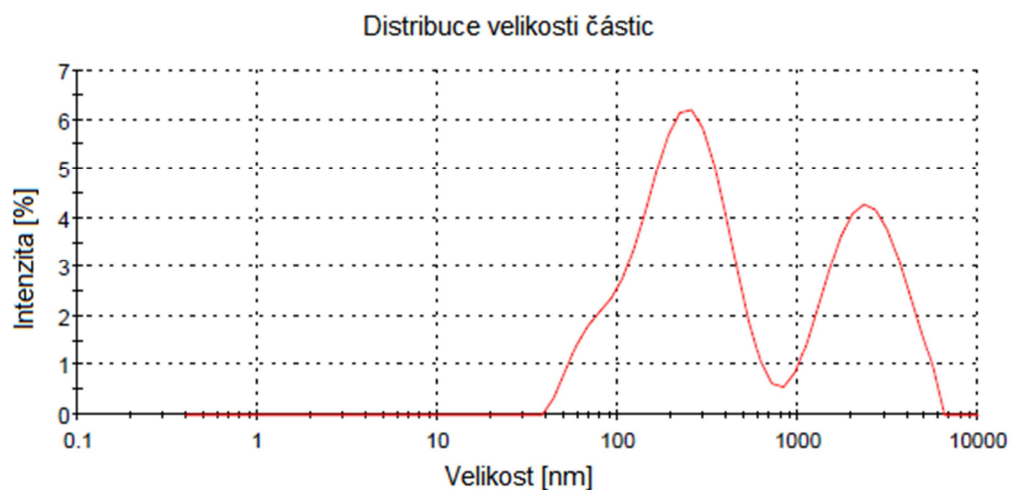
Obr. 17: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml



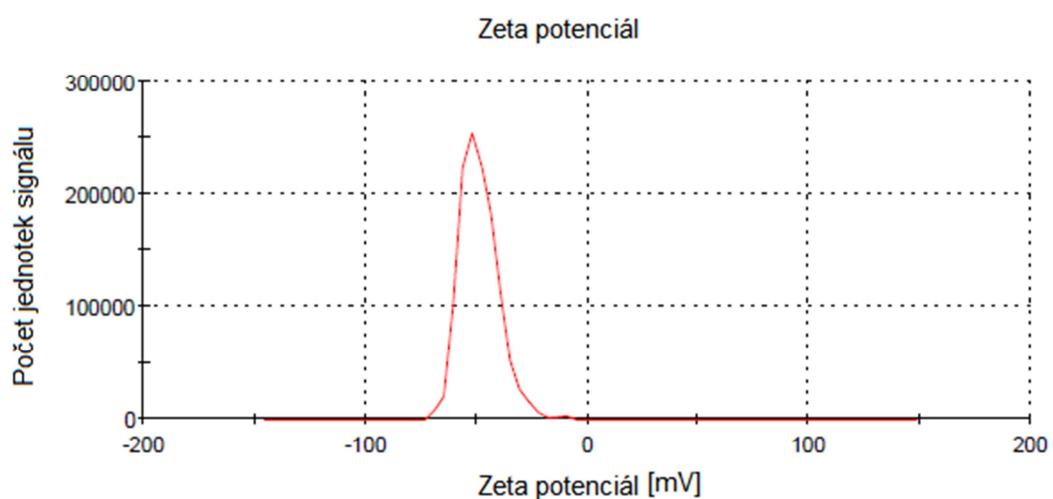
Obr. 18: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



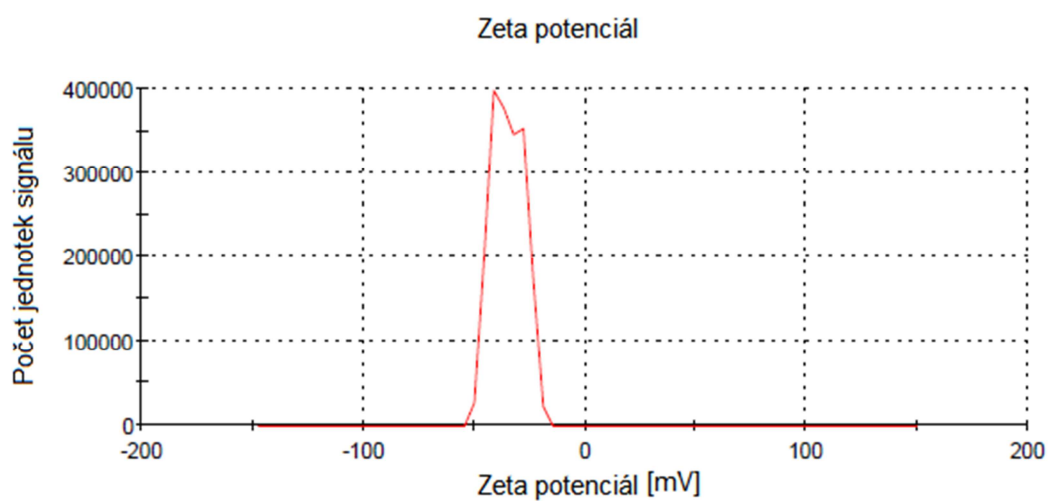
Obr. 19: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml



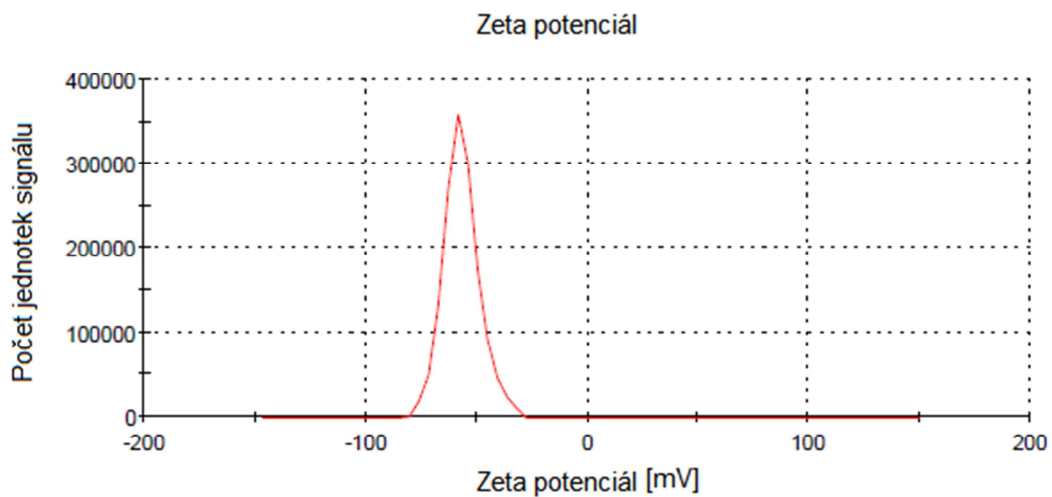
Obr. 20: D Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



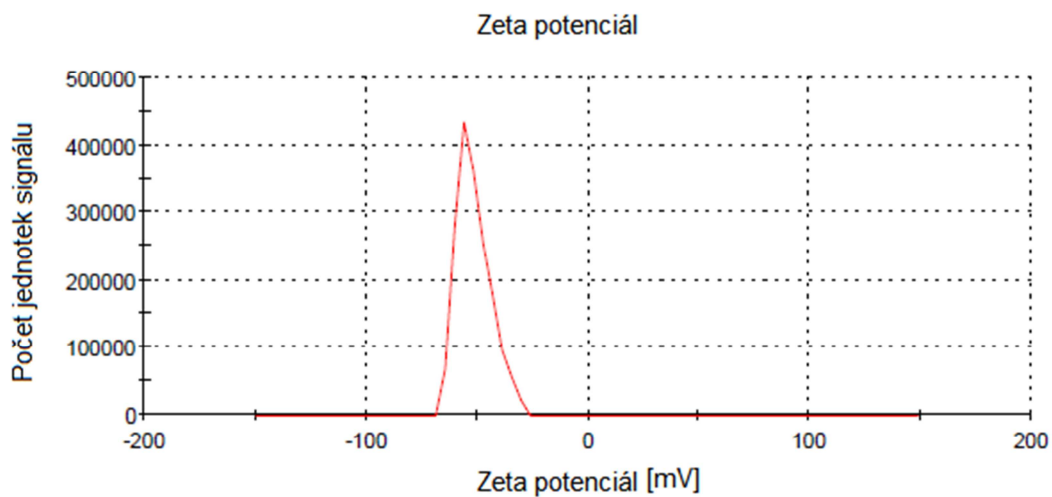
Obr. 21: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml



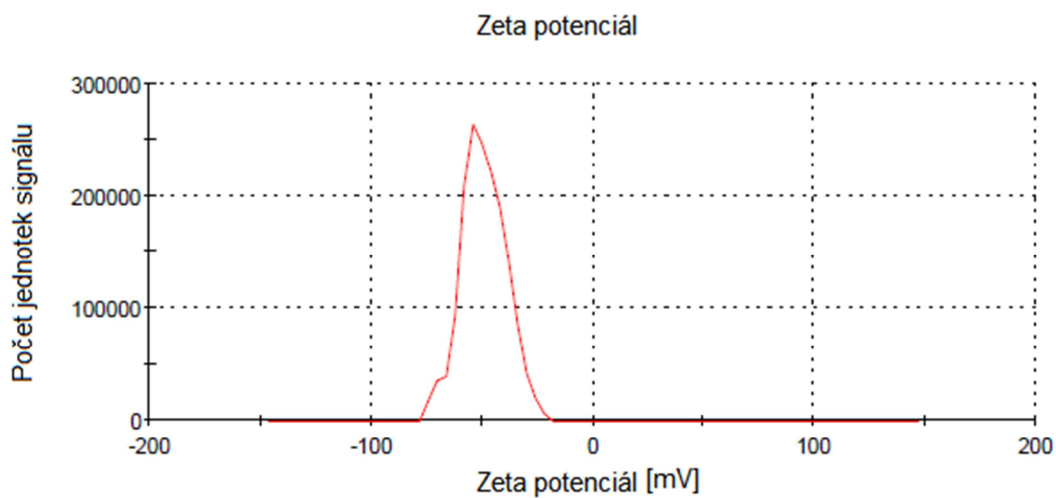
Obr. 22: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



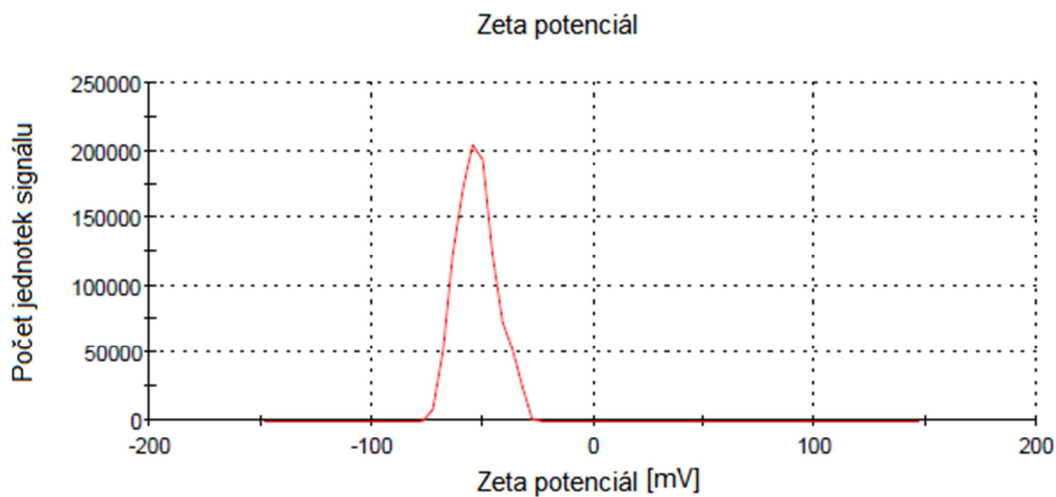
Obr. 23: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml



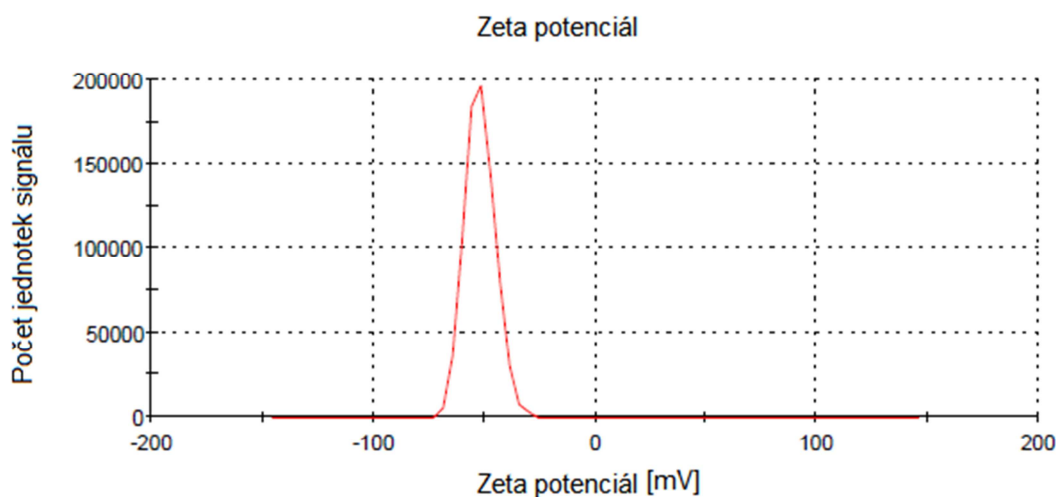
Obr. 24: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



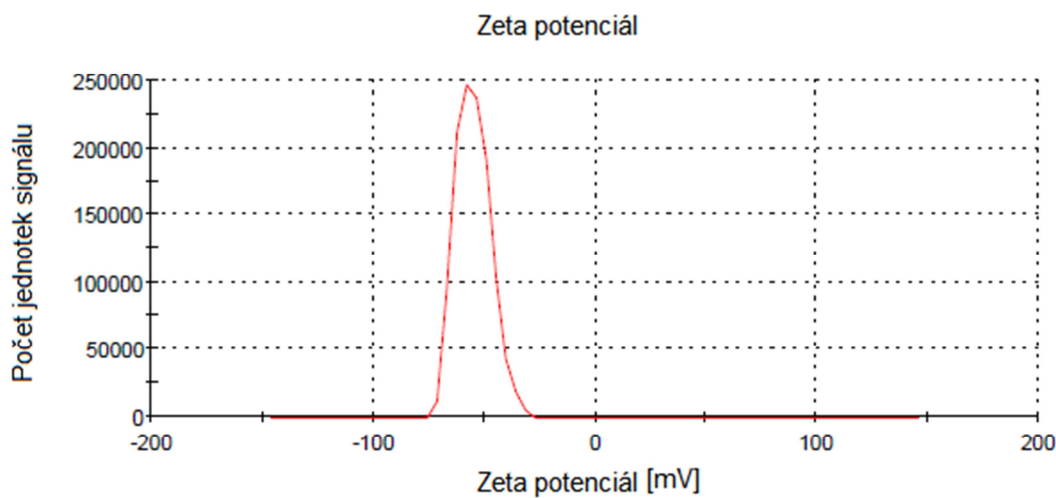
Obr. 25: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml



Obr. 26: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



Obr. 27: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml



Obr. 28: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru

Z grafů pro distribuci velikosti částic lze na první pohled zjistit, že liposomy s enkapsulovaným pankreatinem jsou značně polydisperzní. Tomuto faktu neprospěl ani mezikrok s použitím membránového extrudéru. Rozdíly mezi použitím membránového extrudéru a vzorky bez použití membránového extrudéru jsou až na první koncentraci liposomů minimální, což mohlo být způsobeno např. prasknutím membrány nebo proniknutím vzorku mimo membránu, která sjednocovala velikost liposomů.

Zeta potenciál je téměř u všech vzorků lišícími se pouze odlišnou koncentrací liposomů stejný, a to -50 mV, což znamená, že jsou částice koloidně stabilní a nehrozí koagulace.

6 Závěr

V předložené práci byl studován pankreatin, což je soubor enzymů vylučovaných slinivkou břišní do dvanáctníku, kde štěpí bílkoviny, cukry a tuky z potravy. Práce se zaměřovala na charakterizaci pankreatinu a určení optimálních hodnot pH a teploty pro nejdůležitější enzymatické aktivity pankreatinu, dále na jeho enkapsulaci do liposomů a studium aktivity enkapsulovaných molekul enzymů.

V teoretické části jsou obsaženy obecné informace o enzymech, jejich vlastnosti, mechanismus působení, dále je blíže popsán pankreatin a všechny jeho enzymatické složky, tedy proteázová, amylázová a lipázová, dále také jeho příprava a využití jak v medicíně, tak i v průmyslu. V druhém úseku teoretické části byly blíže vysvětleny hlavní metody používané v bakalářské práci, jako jsou LPLC, elektroforéza a DLS.

Praktická část je rozdělena do tří oddílů. Prvním oddílem je charakterizace pankreatinu jako souboru proteinů, tedy optimalizace metod pro zjištění koncentrace proteinu a zjištění velikosti částí pankreatinu pomocí SDS-PAGE. Druhým oddílem je charakterizace pankreatinu jako souboru enzymů neboli zjišťování optimálních podmínek (pH a teplotu) pro vybrané enzymové aktivity a identifikace částí enzymů a jejich aktivity pomocí LPLC ve dvou formách, iontově výměnná chromatografie a gelová filtrace. Posledním oddílem je enkapsulace pankreatinu do liposomů a studium jejich stability, distribuce velikosti částic a v neposlední řadě také zjišťování aktivity enkapsulovaných enzymů.

Při stanovování koncentrace proteinu byly použity tři různé metody s různými detekčními limity. Nejvyšší detekční limit měla metoda Biuretová, poté H-L a s nejnižším detekčním limitem byla použita metoda dle Bradfordové. Nejlepší výsledky vykazovala metoda H-L, byla tedy proměřena pomocí dvou přístrojů, spektrofotometru a ELISA readeru. U enkapsulační účinnosti byla využita regresní přímka z kalibrační křivky spektrofotometru. Dále bylo proměřeno absorpční spektrum BSA, trypsinu a pankreatinu v UV oblasti. Absorbance albuminu měla maximum ve 230 nm, což odpovídá peptidickým a disulfidickým vazbám a ve 280 nm, což odpovídá aromatickým aminokyselinám. Trypsin má tyto maxima ve 210 nm a také ve 280 nm. Pro pankreatin jsou těmito hodnotami 215 nm a 270 nm.

Pomocí SDS-PAGE byla zjištěna velikost všech částí pankreatinu a tato hodnota se pohybovala v rozmezí od cca 2 kDa po 37 kDa u prvního vzorku pankreatinu, u druhého je patrná i zóna o molekulové hmotnosti do 50 kDa. Trypsin obsažený v pankreatinu má velikost 23 kDa, lipáza z pankreatinu pak okolo 50 kDa, zóna u druhého vzorku pankreatinu tedy náleží pravděpodobně lipáze z pankreatinu. U prvního vzorku tato zóna nelze vidět, což může být způsobeno nízkou koncentrací pankreatinu naneseného na gel.

Enzymatická aktivita byla stanovována pro proteázovou, amylázovou a lipázovou složku pankreatinu pro různé hodnoty teploty a pH. Pro proteázovou aktivitu byly použity dva substráty, azokasein a albumin. Azokasein mění barvu v závislosti na pH, proto enzymatická aktivita byla zatížena chybou způsobenou vyšší absorbancí při vyšších hodnotách pH. Pro amylázovou aktivitu byl použit jako substrát 1% škrob a pro lipázovou aktivitu nitrofenylpalmitát. Maxima pH a teplota měla proteázová aktivita při pH 9,8 a 50 °C, amylázová aktivita byla nejvyšší při pH 7 a teplotě 40 °C a lipázová aktivita měla optimum při pH 7 a teplotě také 50 °C.

Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC bylo určováno ve dvou obměnách, iontoměničová a gelová filtrace. Gelová filtrace ukázala, že nejvíce jsou zastoupeny

molekuly o velikosti cca 2 kDa, byly zastoupeny ale i molekuly větší, o 20 kDa, ale i okolo 50 kDa, tyto výsledky potvrzuje i SDS-PAGE.

Enkapsulace do liposomů byla provedena metodou přímého působení ultrazvuku na směs fosfolipidů a cholesterolu, kdy byly použity rozdílné koncentrace lipidů, a to v rozmezí od 1,25 do 25 mg/ml. Pro stanovení množství enkapsulovaných proteinů byla použita metoda H-L a jako zástupce enzymových aktivit byla vybrána aktivita proteázová. Enkapsulační účinnost se zvyšovala se stoupající koncentrací lipidických složek, při nižších koncentracích byla účinnost malá (od 1-8 %), při použití nejvyšší koncentrace lipidů byla účinnost enormně vyšší, 65 %.

Při zjišťování aktivity enkapsulovaného pankreatinu byla nejdříve změřena aktivita vzorku bez jakékoli úpravy. Tato hodnota aktivity byla nulová, liposomy tedy buď samovolně enzymy neuvolňovaly, nebo vystavení enzymu ultrazvuku je denaturuje. Proto byla tedy studována aktivita enzymu po vystavení ultrazvuku. Enzymová aktivita se z hodnoty bez ultrazvuku ($a=0,071$ U/ml) zvýšila po vystavení vzorku ultrazvuku na $0,102$ U/ml. Je tedy patrné, že ultrazvuk enzymy nedenaturuje, naopak lépe je rozpustí v rozpouštědle a vykazují pak vyšší enzymatickou aktivitu. Pro uvolnění enzymů z liposomů byla použita fosfolipáza D ze zelí, která enzymaticky štěpí fosfolipidovou dvojvrstvu. Po rozsuspendování liposomů v extraktu ze zelí, který obsahuje fosfolipázu D a odečtení proteolytické aktivity samotného zelného extraktu byla jasně patrné, že došlo k narušení fosfolipidové membrány a uvolnění nativních enzymů ze struktury liposomů. Lze tedy konstatovat, že příprava liposomů přímou aplikací ultrazvuku je cestou k efektivní enkapsulaci nativního enzymu.

Jako poslední metoda byl použit přístroj DLS, který měří distribuci velikosti částic a jejich zeta potenciál. Pomocí přístroje DLS byly proměřeny všechny formulace liposomů s enkapsulovanými enzymy a jako porovnání k nim ty samé s použitím membránového extrudéru. Velikost částic je i při použití membránového extrudéru značně nerovnoměrná, od desítek po tisíce nm. Zeta potenciál se pohybuje přibližně okolo hodnoty -50 mV bez ohledu na formulaci liposomů, systém je tedy stabilní, částice nebudou za daných podmínek koagulovat.

7 Seznam použitých zkratk

Rf	Retenční faktor
Mr	Molekulová hmotnost
LPLC	Nízkoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Liquid chromatography, kapalinová chromatografie
GC	Gas chromatography, plynová chromatografie
PC	Paper chromatography, papírová chromatografie
TLC	Thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie
IEC	Exchange chromatography, iontově výměnná chromatografie
GPC	Gel permeation chromatography, gelová permeační chromatografie
SEC	Size exclusion chromatography, gelová filtrace
BSA	Hovězí sérovýalbumin
H-L	Hartree-Lowry
PNF	Paranitrofenol
DLS	Zeta sizer nanoseries, dynamický rozptyl světla
SDS-PAGE	Elektroforéza na polyakralamidovém gelu s použitím dodecylsírany sodného
ELISA reader	Enzyme-linked immunosorbent assai reader

8 Literatura

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0600-1
- [2] SOFROVÁ, Danuše. *Biochemie: základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 241 s. ISBN 80-718-4936-7
- [3] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2. přeprac. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2005, 144 s. ISBN 80-863-6911-0
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4
- [5] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9
- [6] *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody: pro studenty středních škol*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1998, 161 s. ISBN 80-718-3083-6
- [7] HAWLEY, Gessner Goodrich a Richard J LEWIS. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 15th ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2007, 1379 s. ISBN 978-047-1768-654
- [8] VÝZKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÝ PRAHA. *Využití kafilerních materiálů k výrobě biopreparátů a hydrolysátů*. Praha, 2003.
- [9] ALCON LABORATORIES, Inc. *Use of pluronic surfactant to enhance the cleaning effect of pancreatin on contact lenses* [patent]. USA. United States Patent, US005672575A. Uděleno 30.9.1997. Zapsáno 29. 4.1994
- [10] EWALD, Nils, Reinhard G BRETZEL, Ivan G FANTUS, Manfred HOLLENHORST, Hans U KLOER a Philip D HARDT. Pancreatin therapy in patients with insulin-treated diabetes mellitus and exocrine pancreatic insufficiency according to low fecal elastase 1 concentrations. Results of a prospective multi-centre trial. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2007, roč. 23, č. 5, s. 386-391. ISSN 15207552. DOI: 10.1002/dmrr.708. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.708>
- [11] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMML. *Bioanalytické metody*. Praha, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [12] MÁROVÁ, Ivana. *Praktikum z biochemie*. 2. vyd. Brno: VUTIUM
- [13] Chromatografické metody. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V HRADCI KRÁLOVÉ. *Ústav lékařské biochemie: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. Hradec Králové, © Lékařská fakulta UK 2007 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/dokumenty/Seminare/seminářChromatografické>
- [14] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2
- [15] MATHIOWITZ, Edith. *Encyclopedia of controlled drug delivery*. New York: John Wiley, c1999, 21057 s. ISBN 04711666342
- [16] WANG, Binghe, Teruna SIAHAAN a Richard SOLTERO. *Drug delivery: principles and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2005, 448 s. ISBN 04-714-7489-4
- [17] Technology: Dynamic Light Scattering. MALVERN. *Malvern* [online]. © Copyright 2012 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/labeng/technology/technology.htm>

- [18] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. 2004
- [19] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3
- [20] Zeta potenciál zeta. *Krystalografická společnost. Czech and Slovak Crystallographic Association CSCA* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [21] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. *Mini-PROTEAN 3 Cell: Instruction Manual*. Bio-rad Office. Dostupné z: www.bio-rad.com
- [22] PALA, Martin. *Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 44 s. Bakalářská práce. VUT v Brně
- [23] Buffers. In: [online]. Dostupné z: Buffers. COLLEGE OF NATURAL RESOURCES UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Berkley. *Biological imaging facility* [online]. 1999 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html>
- [24] Aminokyseliny. MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *Masarykova univerzita* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/03-Aminokys/03-AK2bez.htm
- [25] Biochemie-základy. *Laboratorní průvodce* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: http://www.labo.cz/mft/biochemie_zaklady.htm
- [26] Preparation of pH buffer solution. *Analytical chemistry Resources* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html>
- [27] PINSIRODOM, Praphan a Kirk L. PARKIN. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Lipas assays*. John Wiley and Sons, Inc., 2003. ISBN 978-047-1142-911
- [28] BIO-RAD. *Gel filtration standard: Instruction manual catalog 151-1901*. California: Bio-Rad Laboratories, Inc., 2000
- [29] SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc. *Pancreatic Lipase (1.BB.985): sc-71840*. Dostupné z: <http://datasheets.scbt.com/sc-71840.pdf>
- [30] SYDPATH. *Lipase*. 1999. Dostupné z: <http://www.syddpath.stvincents.com.au/tests/Lipase.htm>

ABSTRAKT

Práce se zaměřuje na studium enzymatické směsi pankreatinu, její charakterizaci a následnou enkapsulaci do liposomů. Jako srovnávací proteiny byly použity hovězí sérový albumin a trypsin. Charakterizace pankreatinu se skládá ze dvou částí. V první části je práce zaměřena na optimalizaci metod stanovení koncentrace pomocí absorpční spektrofotometrie s využitím základních metod pro identifikaci proteinů (Biuretová metoda, Hartree-Lowryho metoda a Bradfordova metoda). Dále bylo proměřeno absorpční spektrum daného proteinu v UV oblasti. Jako metoda identifikace proteinu a zjištění jeho relativní molekulové hmotnosti byla použita metoda SDS-PAGE. Pro identifikaci složek pankreatinu byla použita LPLC ve dvou modifikacích, iontoměničová chromatografie a gelová filtrace. Druhá část práce je věnovaná charakteristice pankreatinu jako enzymu, primárně zjištění optimálních hodnot pH a teploty pro nejdůležitější enzymatické aktivity pankreatinu – proteolytickou (pH 8,9 a 50°C), amylázovou (pH 7 a 40 °C) a lipolytickou (pH 7 a 50 °C). Poslední část práce zaujímá enkapsulace pankreatinu do liposomů a pomocí přístroje DLS také stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciálu. Částice samovolně neuvolňovaly enkapsulované enzymy, k jejich uvolnění došlo až po aplikaci fosfolipázy D, čímž bylo potvrzeno, že liposomy mohou být použity jako transportní systémy pro nativní enzymy.

Klíčová slova:

Pankreatin, hovězí sérový albumin, trypsin, SDS-PAGE, enzymová aktivita, LPLC, DLS, liposomy, enkapsulace

ABSTRACT

This work focuses on a study of enzyme mixture pancreatin, its characterization and subsequent encapsulation into liposomes. As a reference proteins bovine serum albumin and trypsin were used. Characterization of pancreatin consisted of two parts. The first part focuses on optimization of methods for the concentration determination by absorption spectrophotometry using basic methods for identifying proteins (Biuret method, Hartree-Lowry method and Bradford method). Moreover, UV spectrums of the protein were measured. As a method for identification of protein's molecular weight, SDS-PAGE was used. To identify components of pancreatin, LPLC was employed in two modifications, ion-exchange chromatography and size exclusion chromatography. The second part is dedicated to the characterization of pancreatin as enzyme in terms of pH and temperature optimum for the enzyme activities of protease (pH 9, 8 and 50 °C), amylase (pH 7 and 40 °C) and lipase (pH 7 and 50 °C). The last part of this work aimed at an encapsulation of pancreatin into liposomes and DLS analysis of distribution of particles and their zeta potential. Liposomes did not spontaneously release encapsulated enzyme. To confirm that proteins were successfully entrapped into liposomes, their structure was disrupted by application of phospholipase D. In conclusion, liposomes can be utilized as delivery systems for native enzymes.

Keywords:

Pancreatin, bovine serum albumin, trypsin, SDS-PAGE, enzyme activity, LPLC, DLS, liposomes, encapsulation

WURSTOVÁ, A. *Charakterizace a stabilizace pankreatinu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 62 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za pomoc v laboratoři a cenné rady, a také paní doc. RNDr. Ivaně Márové Csc. za inspiraci a přívětivý přístup.

Obsah

Obsah.....	9
1 Úvod.....	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Obecná charakteristika enzymů.....	12
2.1.1 Klasifikace enzymů.....	12
2.1.2 Struktura molekul enzymů.....	12
2.1.3 Substrátová specifita.....	14
2.1.4 Katalytická účinnost.....	15
2.2 Pankreatin.....	15
2.2.2 Příprava.....	15
2.2.3 Využití.....	16
2.3 Elektroforéza.....	16
2.3.1 LPLC.....	18
2.4 Liposomy.....	20
2.5 DLS metoda stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu.....	22
2.5.1 DLS.....	22
2.5.2 Zeta potenciál.....	22
3 Cíl práce.....	24
4 Experimentální část.....	25
4.1 Použité chemikálie a přístroje.....	25
4.1.1 Chemikálie.....	25
4.1.2 Přístroje.....	25
4.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	25
4.2.1 Biuretová metoda.....	25
4.2.2 Hartree-Lowryho metoda.....	25
4.2.3 Bradfordova metoda.....	26
4.3 Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti.....	26
4.4 Stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy.....	26
4.5 Stanovení pH optima vybraných pankreatických enzymů.....	27
4.5.1 pH optimum proteázové aktivity pankreatinu.....	27
4.5.2 pH optimum amylázové aktivity pankreatinu.....	28
4.5.3 pH optimum lipázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6 Stanovení teplotní aktivity pankreatinu.....	29
4.6.1 Teplotní optimum proteázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6.2 Teplotní optimum amylázové aktivity pankreatinu.....	29
4.6.3 Teplotní optimum lipázové aktivity pankreatinu.....	30
4.7 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC.....	30
4.7.1 Iontoměničová LPLC.....	30
4.7.2 Gelová LPLC.....	30
4.8 Enkapsulace pankreatinu do lipozomů pomocí ultrazvuku.....	30
4.8.1 Stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu.....	31
4.8.2 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí.....	31
4.9 Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu.....	31
5 Výsledky.....	32

5.1	Výsledky stanovení koncentrace proteinů.....	32
5.1.1	Biuretová metoda	32
5.1.2	Hartree – Lowryho metoda	33
5.1.3	Bradfordova metoda	35
5.2	Absorpční spektra vybraných proteinů.....	37
5.3	Výsledky stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy.....	38
5.4	Výsledky stanovení enzymových aktivit pankreatinu v různém pH.....	39
5.4.1	Proteázová aktivita pankreatinu.....	39
5.4.2	Amylázová aktivita pankreatinu	40
5.4.3	Lipázová aktivita pankreatinu	42
5.5	Stanovení teplotního optima jednotlivých enzymů pankreatinu	44
5.5.1	Proteázová aktivita pankreatinu.....	44
5.5.2	Amylázová aktivita pankreatinu	45
5.5.3	Lipázová aktivita pankreatinu	46
5.6	Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC	48
5.6.1	Iontoměničová LPLC	48
5.6.2	Gelová filtrace LPLC.....	48
5.7	Enkapsulace do liposomů.....	49
5.7.1	Výsledky stanovení množství enkapsulovaného pankreatinu	50
5.7.2	Výsledky stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu	50
5.7.3	Výsledky stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciál	51
6	Závěr	58
7	Seznam použitých zkratk.....	60
8	Literatura	61

1 Úvod

Enzymy jsou látky potřebné pro všechny chemické reakce uskutečňující se ve všech živých systémech. Jedna z nejdůležitějších funkcí enzymů v těle je účast při trávení potravy. K tomuto účelu slouží slinivka břišní, tedy orgán trávicí soustavy určen pro produkci pankreatické šťávy obsahující enzymy, které se souhrnně nazývají pankreatin. Jelikož pankreatická šťáva musí umět štěpit bílkoviny, cukry i tuky, jsou v pankreatinu zastoupeny všechny různé enzymy s odlišnými vlastnostmi pro hydrolýzu potravy jakéhokoli charakteru. Jejich přítomnost byla ověřena pomocí SDS-PAGE. V rámci práce byla vyzkoušena enkapsulace pankreatinu do liposomů a byla studována jejich stabilita, možnost transportu enkapsulovaných enzymů, jejich následného uvolňování a distribuce velikosti částic.

Pro enkapsulaci bylo nutné zjistit optimální podmínky účinnosti enzymů, tedy pH a teplota, při nichž mají enzymy nejvyšší účinnost. Pro stanovení enkapsulační účinnosti byly zoptimalizovány metody zjištění celkové koncentrace proteinů a na jejich základě byly sestrojeny kalibrační křivky.

Enkapsulace do liposomů byla provedena přímou ultrazvukací směsí fosfolipidů a cholesterolu. Liposomy pro enkapsulaci byly vybrány z důvodu jejich jednoduchosti, snadné přípravě a netoxicitě. Připravené částice byly studovány jak z hlediska jejich stability pomocí zeta potenciálu, ale také ve smyslu aktivity enkapsulovaných enzymů, kde byly zkoumány vlivy ultrazvuku na samotný enzym. Také bylo studováno působení enzymu fosfolipázy D na liposomy.

Pankreatin se používá jako lék na různé onemocnění slinivky břišní, jako je pankreatitida, cystická fibróza nebo i rakovina. Kromě toho, pankreatin nalézá využití i v průmyslu, kde pomáhá při čištění různých materiálů od biologicky degradovatelných látek.

2 Teoretická část

2.1 Obecná charakteristika enzymů

Enzymy jsou molekuly s katalytickou funkcí, tzn. urychlují chemické přeměny v organismu aniž by ovlivnily složení rovnovážné směsi. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Jestli urychlují chemické přeměny, nazývají se enzymy, pokud katalyzují proces, při kterém nedochází k chemické změně, ale pouze např. ke změnám konformace sloučeniny, jedná se o faktory [1]. Podle zapojení enzymu v reakci se rozlišují na ty, které využívají vlastní polypeptidový řetězec a na ty, které pro svou funkci potřebují ještě organickou neproteinovou složku tzv. koenzym. Koenzymy často vychází z vitaminů, jejichž příjem je v potravě nezbytný. Funkční spojení enzymu s koenzymem se nazývá holoenzym, nefunkční enzym bez koenzymu je apoenzym [2,3]. Katalytickou funkci může vykonávat jednoduchá nebo složená bílkovina. Nebílkovinnou částí enzymů je tzv. kofaktor, například ionty kovů nebo organická molekula, kdy svým spojením nebo spolupůsobením zesiluje katalytický účinek [1,2,3].

Enzymy se vyskytují ve všech živých systémech a počet různých druhů těchto enzymů se odhaduje až na miliardy. Jejich důležitou vlastností je netoxičita, na druhou stranu ale jsou vysoce citlivé a rychle se opotřebovávají, jsou tedy stále odbourávány a znovu syntetizovány [1].

V porovnání s běžnými katalyzátory se liší v mnoha ohledech, např.: urychlují reakce mnohem více než běžné katalyzátory, působí za mírných reakčních podmínek určených organismem, mají vyšší specifitu pro určitou reakci s téměř úplným vyloučením tvorby vedlejších produktů a další [3].

2.1.1 Klasifikace enzymů

Enzymy se rozdělují do šesti základních tříd dle funkce v organismu:

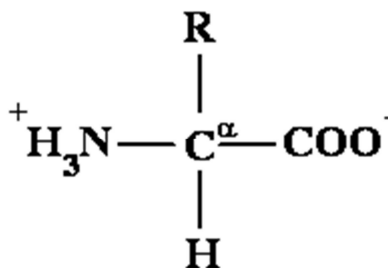
- 1) Oxidoreduktázy – nejpočetnější třída, skládá se pouze ze složených bílkovin, enzymy katalyzují mezimolekulární oxidačně redukční přeměny.
- 2) Transferázy – početná skupina složených bílkovin přenášející skupiny jako např.: $-\text{CH}_3$ a $-\text{NH}_2$ z donoru na akceptor.
- 3) Hydrolázy – početná skupina spíše jednoduchých bílkovin štěpící vazby (jako je peptidová či esterová vazba) hydrolyticky.
- 4) Lyázy – málo početná skupina složených bílkovin katalyzující nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C–C, C–O, C–N.
- 5) Isomerázy – nejméně početná skupina jednoduchých bílkovin realizující intramolekulové přesuny atomů a skupin neboli přeměny izomerů.
- 6) Ligázy – málo početná skupina složených bílkovin katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za rozkladu látky uvolňující energii [1].

2.1.2 Struktura molekul enzymů

2.1.2.1 Aminokyseliny

Všechny známé enzymy jsou bílkovinné povahy [2]. Základní stavební jednotkou bílkovin jsou aminokyseliny, kterých je celkově 20, a jejich různými kombinacemi jsou vytvořeny všechny bílkoviny živých systémů. Tyto základní aminokyseliny se nazývají kódované

aminokyseliny, všechny jsou tzv. typu α , což znamená, že karboxylová i amino skupina je vázána na stejný atom uhlíku [4]. Základní struktura u všech aminokyselin je identická viz. Obr. 1.



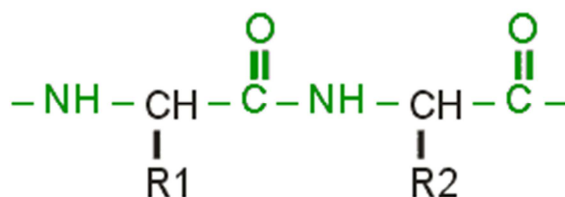
Obr. 1: Základní struktura aminokyselin [23]

Všechny kódované aminokyseliny mají triviální názvy nebo jsou odvozeny z názvu zdroje, z něhož byly izolovány nebo z výrazné vlastnosti. Ke zkrácenému zápisu slouží první tři písmena triviálního názvu. S výjimkou nejjednodušší aminokyseliny, glycinu, obsahují ve své struktuře chirální uhlík C^α , existují tedy ve dvou konfiguracích lišících se pouze v prostorové orientaci. Tyto dvě sloučeniny se pak nazývají enantiomery, značí se L a D konfigurace podle aminoskupiny ležící buďto vpravo (D) nebo vlevo (L). V bílkovinách se vyskytují pouze formy typu L. Aminokyseliny se dále dělí také na nepolární (hydrofóbní) a polární (hydrofilní) podle postranního řetězce. Do tohoto rozdělení ale opět nemůžeme zahrnout glycin.

Aminokyseliny mají bipolární charakter, řadí se tedy mezi amfolyty, neboli chovají se jako kyseliny i jako zásady podle pH prostředí. Je-li náboj amfolytu nulový, říkáme, že je v izoelektrickém stavu, který je charakterizován hodnotou pH roztoku, v němž amfolyt neputuje v elektrickém poli. Toto pH se nazývá izoelektrický bod pI [4].

2.1.2.2 Kovalentní struktura

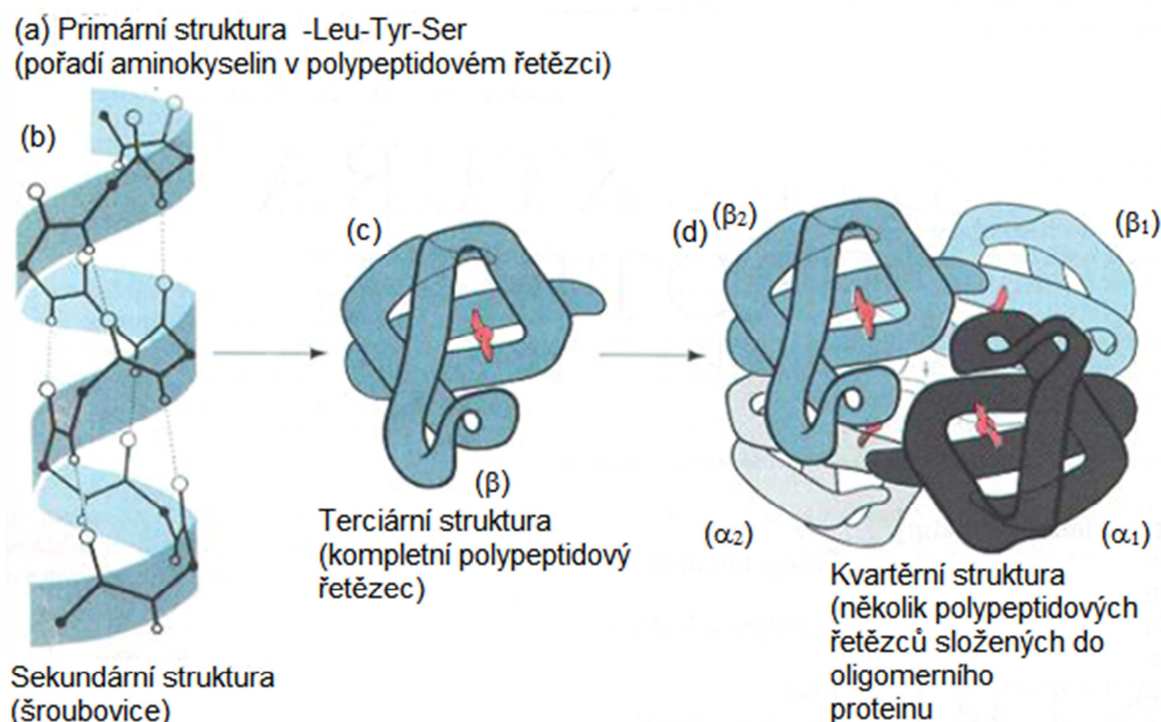
Základním prvkem enzymů i všech ostatních druhů bílkovin je peptidová vazba [4]. Vzniká kondenzací karboxylové skupiny a aminokyseliny za odštěpení vody [2]. Jejím prostřednictvím jsou spojeny jednotlivé aminokyselinové jednotky v polymerním řetězci [4].



Obr. 2: Znáznornění peptidové vazby v primární struktuře bílkovin [24]

Řetězec tvořený ze dvou a více aminokyselin spojených peptidovou vazbou se označuje peptid [2]. Sekvence monomerních jednotek v biopolymerním řetězci se nazývá primární struktura, což je první ze čtyř úrovní struktury proteinu [4]. Pořadí aminokyselin se zapisuje zkratkami [2]. Sekundární struktura je prostorové uspořádání v určitém místě hlavního řetězce bez ohledu na jeho postranní řetězec, buďto α -helix nebo β -skládaný list. Terciární strukturou se rozumí trojrozměrná struktura celého polypeptidu a kvartérní struktura se vztahuje k prostorovému uspořádání jejich podjednotek, což znamená, že se protein skládá

ze dvou či více polypeptidových řetězců, které jsou vzájemně spojeny nekovalentními vazbami a v některých případech i disulfidickými můstky [5].



Obr. 3: Struktura hierarchie proteinu [5]

2.1.3 Substrátová specifita

V roce 1894 vyslovil E. Fisher teorii klíče (substrátu) a zámku (enzym), tzv. teorii komplementarity, která se snažila vysvětlit substrátovou specifitu činnosti enzymu [4]. Její podstatou je, že účinná je pouze omezená část molekuly, aktivní centrum, které tvoří oblast umožňující kontakt pouze se substrátem, který má přesnou geometricky doplňkovou strukturu. Tato představa snadno vysvětlí, proč enzym nepůsobí na látky, které mají větší molekulu než specifické substráty [1,4].

Na počátku 20. století vznikla druhá teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové, jejímž předpokladem je vázání molekul enzymu na substrát za tvorby meziproduktu a jeho existence byla opakovaně prokázána [1,6].

V 70. letech se pomocí rentgenové strukturní analýzy krystalů enzymů umožnil výklad mechanismu činnosti enzymů v pojmech struktury jejich molekul. Zjistilo se tedy, že při realizaci katalytických funkcí hrají důležitou roli konformační změny a teorie zámku a klíče byla nahrazena představou ruka v rukavici, kdy aktivní centrum není předem zformovaná struktura, ale substrát vyvolá změnu konformace enzymu [6].

Katalytický účinek enzymů spočívá v realizaci mechanismu s aktivační energií nižší než u nekatalyzované reakce. Nejprve se váže substrát na aktivní centrum nacházející se v bílkovinné části enzymu za vzniku komplexu enzym-substrát. V aktivním centru vázaný substrát se dostává do přímého kontaktu s vhodně nasměřovanými katalytickými skupinami, což umožní hladký průběh reakce [1,6].

2.1.4 Katalytická účinnost

Od roku 1961 zavedla enzymová komise IUB mezinárodní jednotku aktivity 1U, která představuje množství enzymu katalyzujícího při 30 °C a optimálním pH přeměnu 1μmol substrátu za minutu. V této práci je upřednostňovaná jednotka U vztažená na 1 ml.

V roce 1972 po zavedení jednotek SI byla definovaná jednotka katal. 1 kat představuje množství katalyzátoru, které přemění za standardních podmínek za 1 sekundu 1 mol substrátu. Jelikož je tato jednotka vysoká, jsou uváděny její zlomky, respektive nanokataly ($\text{nkat} = 10^{-9} \text{kat}$) [1].

Vztah určující přepočítání z U na kat je $1 \text{ U} = 16,67 \cdot 10^{-9} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$ [4].

2.2 Pankreatin

Co se týče vizuálních vlastností, pankreatin je amorfni prášek krémové barvy a charakteristického zápachu částečně rozpustný ve vodě a nerozpustný v alkoholu [7]. Pankreatin je souhrnný název pro směs enzymů vylučovaných slinivkou břišní. Pankreatické enzymy pomáhají trávit bílkoviny, sacharidy i lipidy a podle toho, jaké složky potravy rozkládají, se rozdělují podle účinku do tří tříd.

2.2.1.1 Proteázy

Proteázy neboli proteolytické enzymy katalyzují proteolýzu, což je hydrolytické štěpení bílkovin. Proteázy se dělí do dvou skupin, na endopeptidázy (proteínázy), které katalyzují hydrolyzu uvnitř řetězce za vzniku peptidů různé velikosti, a na exopeptidázy, které katalyzují hydrolytické štěpení pouze koncové aminokyseliny z polypeptidového řetězce. Proteázy nejsou substrátově specifické, štěpí tedy všechny bílkoviny, ale vykazují specifitu k určitým strukturám polypeptidového řetězce. Aktivovaná pankreatická šťáva obsahuje 7 proteáz, a to endopeptidázy trypsin, chymotrypsin A, B, C a elastázu. Mezi exopeptidázy patří karboxypeptidáza A a B [1].

2.2.1.2 Amylázy

Amylázy jsou enzymy katalyzující štěpení oligo a polysacharidů pomocí hydrolytického štěpení na monosacharidy, nejčastěji glukózu, což je hlavní zdroj energie pro metabolismus. Nejdůležitějšími enzymy jsou glukosidázy amylázy, tedy α -amyláza, která odbourává amylozu, tedy nevětvený polypeptid. Pro štěpení větvených polypeptidů slouží enzym amyloglukosidáza a maltáza pak štěpí disacharid maltózu. Na trávení sacharidů se podílí ještě další enzymy jako např.: izomaltáza, laktáza a sacharáza [1,5].

2.2.1.3 Lipázy

Lipázy, nebo karboxylesterázy jsou enzymy katalyzující hydrolytické odbourávání lipidů tím, že štěpí triacylglyceroly na mono- a diacyl glyceroly a sodné či draselné soli mastných kyselin neboli mýdel. Ty jsou amfipatické, napomáhají tedy emulgaci lipidů a usnadňuje jejich štěpení. K aktivaci potřebují emulgující látky a vápenaté ionty [1,5].

2.2.2 Příprava

Výroba pankreatinu spočívá ve zpracování surové slinivky břišní macerací s chloroformem a vodou. Dále je směs rozpuštěna v kyselině borité s glycerolem a následně zfiltrována a přebytečná rozpouštědla jsou odpařena [7].

2.2.3 Využití

Nejčastější využití nachází pankreatin v léčbě trávicích potíží způsobených dysfunkcí slinivky břišní, tedy v medicínské oblasti. Je také vhodným doplňkem stravy pro starší pacienty trpícími horším zažíváním. Průmyslové využití také vyplývá z jeho enzymatických vlastností, kdy je použit především k čištění produktů obsahujících enzymaticky rozložitelné i nerozložitelné materiály.

2.2.3.1 Průmyslové využití pankreatinu

Hlavní průmyslové využití spočívá v použití proteázové aktivity k čištění materiálů od enzymaticky rozložitelného materiálu (buňky, tkáň), kdy zůstávají enzymaticky nerozložitelné materiály (kolagen, keratin a další). Tento princip je využit např. při moření kůže nebo při rozkladu kafilerních zbytků [8].

Jedna z dalších možností průmyslového využití pankreatinu je v rámci jeho proteolytické aktivity aplikace do čistících roztoků kontaktních čoček, které jsou jinak citlivé na jiné typy čištění. Účinek spočívá v cíleném odbourání biologického materiálu ulpěného na čočkách. Součástí takového preparátu je také netoxická organická povrchově aktivní látka, případně chelatační činidlo a močovina [9]. Obdobné využití nalézá pankreatin také při odstraňování škrobu a bílkovin z textilií [7].

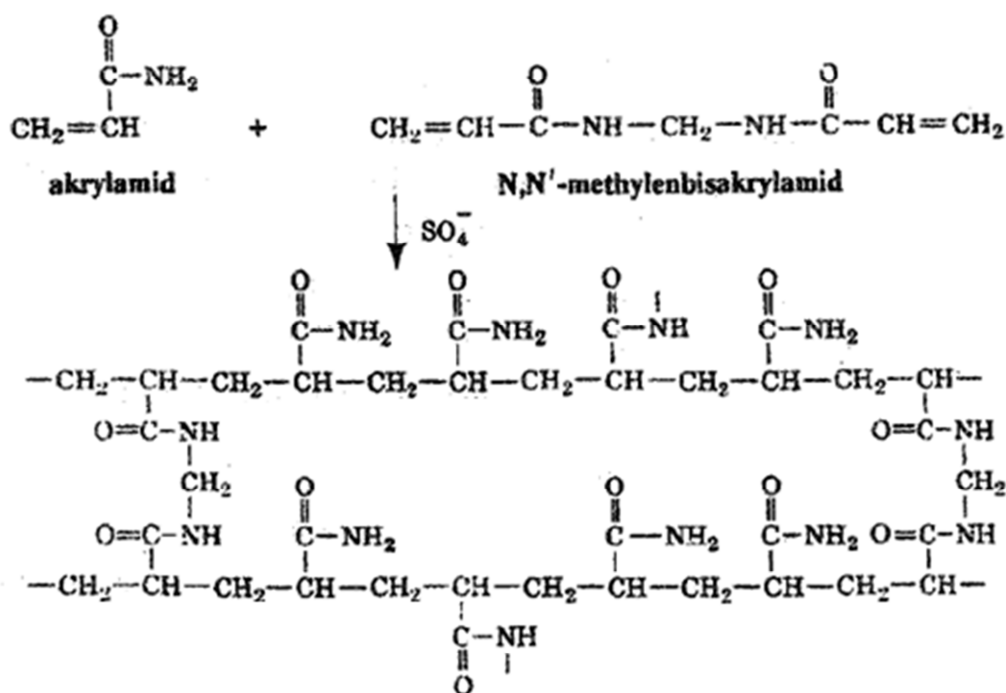
2.2.3.2 Využití pankreatinu v medicíně

Pankreatické enzymy neboli pankreatin jsou využívány v humánní i veterinární medicíně jako digestiva, např. jsou součástí komerčního preparátu Wobenzym [8]. Dále také při dysfunkcích slinivky břišní, případně onemocněních jako jsou záněty či rakovina. Své uplatnění pankreatin nalézá při léčbě diabetu, kdy je pomocí pankreatinu zlepšováno vylučování inzulínu [10]. Byl zaznamenán i úspěch při léčbě cystické fibrózy, jejímž příznakem jsou záněty slinivky břišní [8].

2.3 Elektroforéza

Elektromigrační nebo elektroforetické metody jsou techniky využívající k separaci pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Jestliže jsou částice nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, rozpohybují se konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, kdy anionty putují k anodě a kationty ke katodě. Částice jsou při průchodu okolním médiem vystaveny odporu sil vnitřního tření. V průběhu elektroforézy se ustanoví rovnováha mezi silami vnitřního tření a silou elektrického pole, budou mít tedy tyto síly stejnou hodnotu, ale opačného směru. Z toho vyplývá, že malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu, zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Elektroforéza se provádí na tzv. nosičích. Prvními používanými nosiči byly chromatografický papír, acetát celulózy, škrob, celulóza. V současnosti se používají gelové materiály [11]. Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. U běžně používaných gelů jako je agaróza, škrob nebo polyakrylamid lze ovlivnit separaci změnou velikosti pórů odlišným poměrem složek gelu. Používaný nosič by měl být stabilní, inertní, vodivý, hydrofilní a nerozpustný ve vodě a jeho struktura nesmí bránit migraci iontů ve vodném prostředí, což polyakrylamidový gel splňuje. Vzniká polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\cdot -}$) neboli APS. Stabilizátor radikálů ve směsi se provádí přidávkou TEMEDu (N,N,N',N'-

tetramethylethyldiamin). Nejčastěji používané celkové koncentrace akrylamidu jsou 3 – 15% [12,11].



Obr. 4: Struktura polyakrylamidového gelu [11]

Existují dva typy experimentálního uspořádání elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Řeč je o elektroforéze v trubičkách nebo v plošném uspořádání neboli v tenké vrstvě [11]. Dělení technik vertikální PAGE není podle typu gelu či jeho tvaru, ale podle toho, zda je v kontinuálním nebo diskontinuálním systému [12]. Kontinuální systémy mají nevýhodu v podobě vyššího stupně difuze u menších molekul s vyšší rychlostí prostupu gelem. K vyřešení problému byla zavedena diskontinuální elektroforéza [11]. Velmi ostré zóny se získávají touto diskontinuální elektroforézou při použití dvou různých gelů a několik odlišných pufrů o různém pH. Separační gel neboli dolní gel je překryt cca 1 cm vrstvou tzv. zaostřovacího neboli startovního gelu s velkými póry. Zaostřovací gel a vzorkovací pufr obsahují Tris-chloridový pufr, jehož pH 6,8 je o dvě jednotky nižší než má pufr dělicího gelu pH 8,8. Elektrodový roztok obsahuje Tris-glycinový pufr o pH 8,3. V prostředí zaostřovacího gelu je nejpohyblivějším anionem chloridový ion, pohyblivost komponent vzorku bílkovin je tedy menší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Hodnota intenzity proudu je nastavena na konstantní velikost, seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí, dochází k vzniku ostře ohraničených za sebou následujících zón iontů. Rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu, projevuje se samozaostřující efekt (zpozdí-li se některý ion za zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí a naopak. Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší hodnotu pH, se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridových iontech a současně v důsledku různé pohyblivosti v gelové matici dochází k rozdělení zón podle náboje a velikosti od sebe. Pohyb čela se indikuje přidáním

nízkomolekulárního barviva bromfenolové modři ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem [12].

V této práci se setkáme s variantou PAGE s anionaktivním detergentem dodecylsíránem sodným (PAGE-SDS), který nese záporný náboj a ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin. Bílkoviny se pohybují v gelu již jen podle velikosti [11]. SDS se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na gram bílkoviny a udílí jim uniformní záporný náboj. Nabité skupiny jsou pak v kontaktu s pufrům. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidické můstky např.: pomocí látek redukujících disulfidové můstky jako jsou merkaptoethanol nebo dithithreitol. V dalším kroku se provádí zahřátí vzorku na 60 či 100 °C po několik minut. Z kalibračních grafů závislosti relativní vzdálenosti R_f na logaritmu relativní molekulové hmotnosti $\log M_r$ standardů lze stanovit molekulovou hmotnost vzorku [12]. Nevýhodou této metody je inaktivace a denaturace enzymu [11].

2.3.1 LPLC

2.3.1.1 Obecná charakteristika chromatografie

Chromatografie je široce používanou metodou pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty a patří dnes k nejvýznamnějším analytickým i preparativním metodám [13]. Chromatografie je tedy kvalitativní separační metoda, kde se oddělují složky obsažené ve vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní, kde stacionární je pevná látka nebo s ní nepohyblivě spojený povlak kapaliny, která je vlastní účinnou složkou chromatografického zařízení, kdežto mobilní fáze je kapalina nebo plyn, která unáší složky dělené směsi přes stacionární fázi. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze se dostává vzorek přes celou stacionární soustavu. Složky vzorku, které jsou ve stacionární fázi zachycovány, se při pohybu opoždují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Nejrychleji se na konec stacionární fáze dostanou složky stacionární fází téměř nezadržované. Touto metodou se složky vzorku od sebe separují [11,13].

2.3.1.2 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství, a proto se rozdělují do skupin podle několika kritérií:

Podle účelu

Analytická chromatografie: slouží k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi a pracuje obecně s velmi malým množstvím vzorku.

Preparativní chromatografie: jednotlivé složky směsi od sebe rozdělit v dostatečném množství, aby bylo možno dále je zpracovávat a využít [13].

Podle skupenství mobilní fáze a techniky

Kapalinová chromatografie neboli Liquid Chromatography (LC): mobilní fází je kapalina.

Plynová chromatografie neboli Gas Chromatography (GC): mobilní fází je plyn [14].

Podle uspořádání stacionární fáze

Sloupcové techniky:

Kolonová chromatografie nízkotlaká: stacionární fáze je umístěna v koloně (skleněné) a mobilní fáze jí protéká pomocí gravitace či čerpadla.

Kolonová chromatografie vysokoúčinná: stacionární fáze je umístěna v koloně (kovové), kdy mobilní fáze jí protéká za pomoci pump.

Plošné techniky:

Papírová chromatografie neboli Paper chromatography (PC): stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkovrstvá chromatografie neboli Thin layer chromatography (TLC): stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu např.: skleněné desce nebo hliníkové fólii [14,13].

Podle povahy děje převládající při separaci

Při separaci se zároveň uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů, jeden z nich však převládá.

Rozdělovací chromatografie: o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi.

Adsorpční chromatografie: o separaci rozhoduje různá schopnost složek adsorbovat se na povrch pevné stacionární fáze.

Iontově – výměnná chromatografie (ionexová): o separaci rozhodují různě velké elektrostatické síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze, který je v tomto případě iontoměničem, a ionty vzorku.

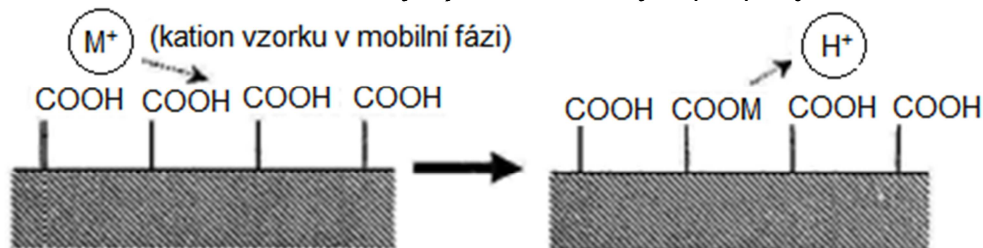
Gelová (permeační) chromatografie (gelová filtrace): složky se separují podle velikosti na gelové pórovité stacionární fázi na principu molekulové síťového efektu.

Afinitní chromatografie: složky se separují pomocí stacionární fáze schopné vázat určité složky vzorku, ke kterým má afinitu neboli úzce selektivní vztah [14,13].

V této práci se pracovalo s nízkotlakou kapalinovou chromatografií (LPLC) ve dvou obměnách, a to iontově – výměnná a gelová filtrace.

2.3.1.3 Iontově – výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie neboli ion Exchange Chromatography (IEC) je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů. Její stacionární fází je měnič iontů, kterým bývá makromolekulární matrice např.: polystyren, celulóza, dextran aj. s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. V protékající mobilní fázi jsou přítomné ionty opačného náboje a jsou elektrostatickými silami přitaženy a dostatečně pevně zadrženy na povrchu stacionární fáze. Mobilní fází bývají vodné roztoky např.: pufrů.



Obr. 5: Výměna iontů na povrchu iontoměniče [14]

Ionexy neboli iontoměniče se dělí na anexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité a slouží k výměně aniontů, a katexy, jejichž funkční skupiny jsou kyselé a slouží k výměně kationtů. Nejčastějšími skupinami chemicky vázanými na povrchu anexů podle vzrůstající síly jsou: primární aminy $-NH_2$, sekundární aminy $-NHR$, terciární aminy $-NR_2$ a kvartérní amoniové báze $-N^+R_3$.

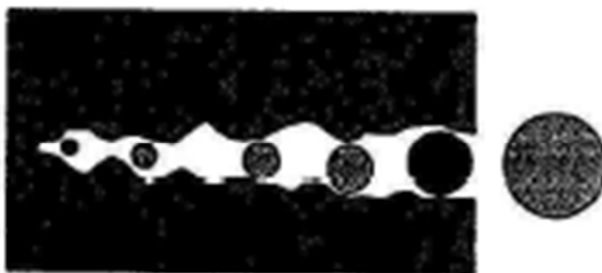
U katexů se potom setkáváme podle vzrůstající síly se skupinami kyselými: fenolická skupina $-OH$, karboxylová skupina $-COOH$, fosfátová skupina $-PO(OH)_2$ a sulfátová skupina $-SO_3H$.

Iontová chromatografie se hojně používá k separaci slabých organických kyselin a zásad i anorganických iontů. Je to oblíbená metoda pro separaci léčiv, nukleových kyselin, aminokyselin, lanthanoidů i aktinoidů.

Retence (zdržení) je řízena změnou pH nebo změnou iontové síly pufru [14,13].

2.3.1.4 Gelová filtrace

U gelové permeační chromatografie neboli Gel Permeation Chromatography (GPC) nebo také Size Exclusion Chromatography (SEC) jsou molekuly separovány podle své velikosti díky rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek rozdělovány mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze se nachází mezi jednotlivými zrnky a stacionární fází je samotný gel. Malé molekuly tedy pronikají hlouběji do pórů gelu a budou se vyplavovat z kolony jako poslední, zatímco velké molekuly se do pórů nedostanou a jsou mobilní fází eluovány jako první.

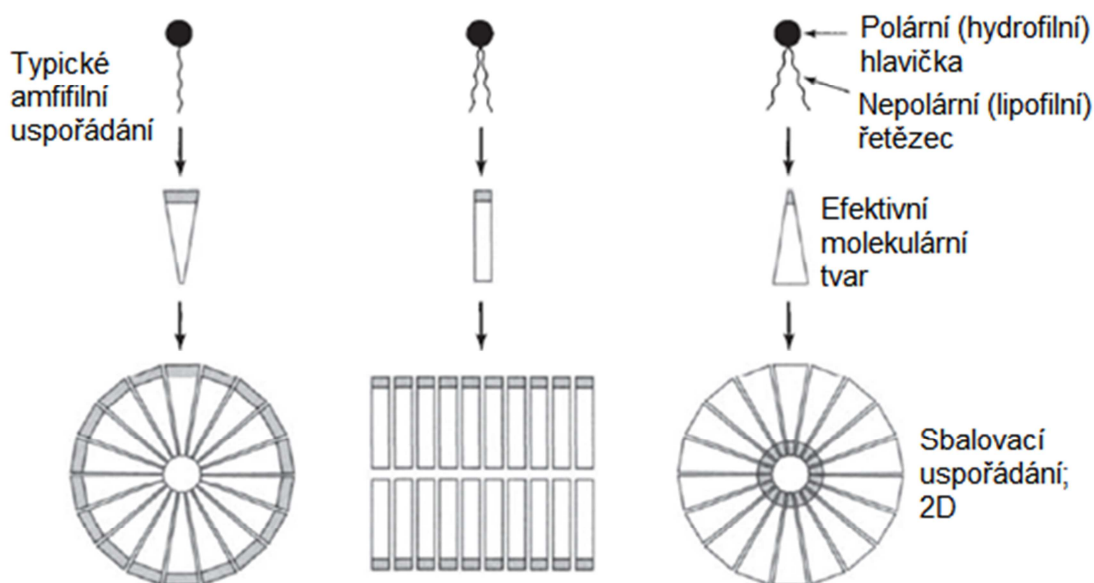


Obr. 6: Permeace molekul o různé velikosti v póru gelu [14]

GPC slouží pro dělení směsí vysokomolekulárních látek, hlavně bílkovin, podle jejich molekulových hmotností. Nezbytnou podmínkou pro chromatografii je, aby materiál dělicího média byl ke všem děleným složkám zcela inertní a specificky nezadržoval žádnou z nich [14,13].

2.4 Liposomy

Liposomy jsou mikročástice tvořené vysoce organizovanými lipidovými molekulami rozptýlenými obvykle v hydrofilním rozpouštědle, nejčastěji ve vodě. Charakteristickým rysem liposomů je lamelární uspořádání lipidových částí [15]. Tyto lipidové části mají amfifilní charakter, což znamená, že musí obsahovat jak hydrofobní, tak i hydrofilní konce, které mají tendenci se k sobě natáčet a vytvářejí dvojvrstvu [11]. Podle typu rozpouštědla jsou známy různé formy uspořádání lipidové dvojvrstvy, viz. Obr. 7. Díky konformaci, kterou vytvářejí, jsou ideálními částicemi, pro použití k enkapsulaci.



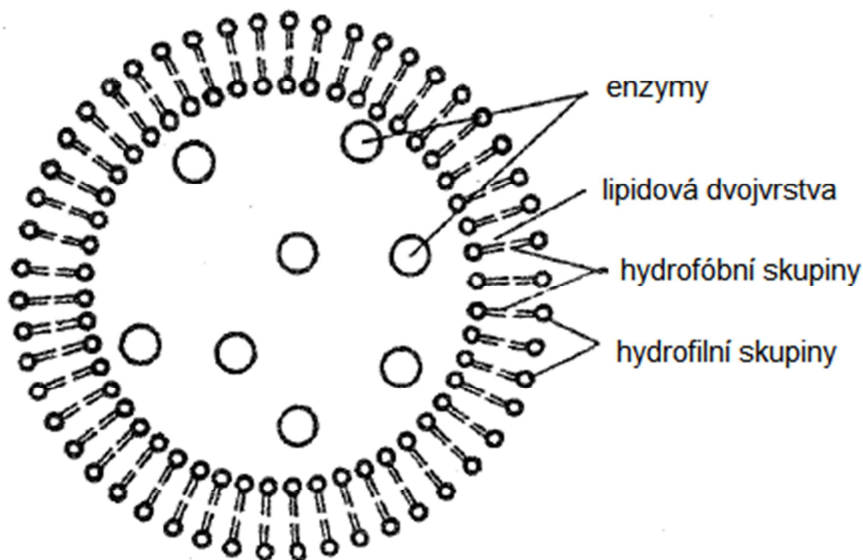
Obr. 7: Struktury liposomů v rozdílných rozpouštědlech [15]

2.4.1.1 Enkapsulace do liposomů

Enkapsulace je proces, při kterém jsou vybrané molekuly, v našem případě enzymy, uzavřeny do částic. Tím je zabráněno difuzi enzymu do okolního prostředí [11].

Při třepání ultrazvukovými vlnami tzv. sonikaci s enkapsulovanou látkou se fosfolipidové struktury přeskupují a vytváří liposomy s látkou zabudovanou do jeho struktury [5]. Podle charakteru látky se zabuduje do různých částí liposomu. Ve vodném prostředí jsou hydrofobní látky zabudovány do lipidové dvojvrstvy a hydrofilní látky uvnitř liposomu [16].

Při liposomovém sbalování se vytváří měkké, neformovatelné a téměř kapalné lipidové membrány, srovnatelné s membránami buněk. Vzhledem ke křehkosti a neformovatelnosti liposomových částic není tato technika vhodná pro průmyslové aplikace, ale je velmi významná při aplikaci enzymů v medicíně [11].



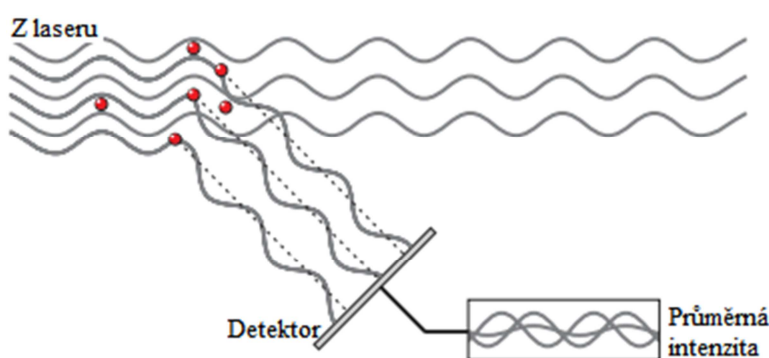
Obr. 8: Enzym enkapsulovaný do liposomu [11]

2.5 DLS metoda stanovování distribuce velikosti částic a zeta potenciálu

2.5.1 DLS

DLS neboli dynamický rozptyl světla je neinvazivní technika pro měření velikosti molekul a částic pro hodnoty velikostí od 1 nanometru po cca 4 mikrometry. Používá se k charakterizaci distribuce velikosti částic emulzí a dispergovaných koloidních částic v kapalině např.: proteinů, micel, polymerů, liposomů, atd..

Princip této metody spočívá v měření Brownova pohybu, což je náhodný pohyb částic v tekutém médiu vyvolaný neustálým srážením molekul roztoku vlivem tepelné energie. Částice osvětlené laserem se dostávají do kolize se světelnými paprsky, které se o ně následně rozptylují. Detektor analýzou výkyvů intenzity světla zjišťuje Brownův pohyb, ze kterého lze určit velikosti částic [17].

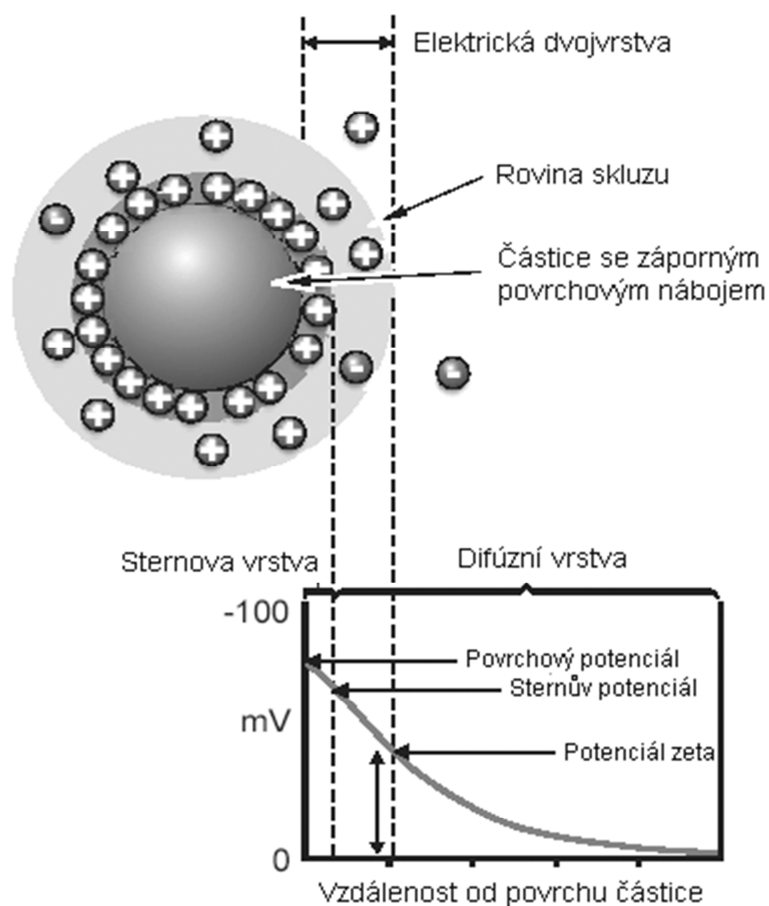


Obr. 9: Princip detekce rozptylu světla pomocí laseru [18]

2.5.2 Zeta potenciál

Měření zeta potenciálu se používá pro zjišťování stability disperzního systému. Zeta potenciál neboli elektrokinetický potenciál je jedna z hlavních sil, které zprostředkovávají mezičásticové interakce [17]. Povrch částice může získat náboj různými způsoby např.: sorpcí iontů z roztoku, což vede k vytvoření vrstvy kolem částice, která se nazývá elektrická dvojvrstva viz. Obr. 3. Struktura této dvojvrstvy měla tři teorie. Helmholtzova teorie říká, že elektrická dvojvrstva je kompletně vázána na povrch částice, což bylo vyloučeno existencí elektroforézy, která by nemohla fungovat, částice by se chovala jako elektroneutrální. Druhou teorií byla Gonyho difuzní, kdy povrch váže pouze ionty jednoho druhu, druhé ionty jsou vzdáleny. Třetí, a správná teorie, je Sternova, který říká, že elektrická dvojvrstva se skládá z pevné i difuzní (vzdálené) části a na částici zůstává parciální náboj viz. Obr. 3 [19].

Pevná část elektrické dvojvrstvy má lineární průběh potenciálu, který se nazývá povrchový potenciál. Difuzní část elektrické dvojvrstvy má zaoblenou křivku a nazývá se zeta potenciál viz. Obr. 3. Helmholtzova teorie může nastat v okamžiku, kdy zeta potenciál bude roven 0, mluvíme pak o izoelektrickém bodu a nastává koagulace. Čím větší je hodnota zeta potenciálu (nezáleží na znaménku), tím více se difuzní části odpuzují a tím zabraňují koagulaci. Koagulace započne, když se překročí hodnota prahu koagulace (mV), od překročení prahu až do izoelektrického bodu je oblast tzv. pomalé koagulace (± 30 mV), po dosažení zeta potenciálu rovného nule, koagulaci nic nebrání, jedná se tedy o oblast rychlé koagulace [19].



Obr. 10: Zeta potenciál, Sternova vrstva a jejich grafické znázornění [18,20]

Zeta potenciál je měřen pomocí elektrického pole v dispezním roztoku. Částice přecházejí k elektrodě s opačným nábojem a rychlostí úměrnou velikosti zeta potenciálu. Rychlost se měří za použití laserového anemometru [17].

3 Cíl práce

- 1) Optimalizace metod stanovení koncentrace pankreatinu a trypsinu základními spektrofotometrickými metodami
- 2) Identifikace pankreatinu a trypsinu pomocí PAGE-SDS
- 3) Stanovení teplotních a pH optim pankreatinu
- 4) Enkapsulace pankreatinu do liposomů, analýza enkapsulovaných částic a stability částic
- 5) Analýza enzymové aktivity enkapsulovaných částic

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Pankreatin, Sigma – Aldrich (Německo)
Azokasein, Sigma – Aldrich (Německo)
Albumin bovine, Serva (Německo)
Trypsin, Sigma – Aldrich (Německo)
Lipáza z pankreatinu, Sigma – Aldrich (Německo)
Glycin, Serva (Německo)
Nitrofenylpalmitát, Sigma – Aldrich (Německo)

4.1.2 Přístroje

IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
ELISA ReaderBioTek ELx808
Sada BIORAD Mini-PRTOEAN®
Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer ZS
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline
Centrifuga Boeco
Analytické váhy Boeco
Nízkotlaká kapalinová chromatografie BioLogic LP, BioRad

4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Pro kvantifikaci proteinů existuje řada metod. Mezi ty nejzákladnější patří např.: ninhydrinová metoda, stanovení z UV spektra, Bradfordova metoda Kjeldahlova metoda, metody založené na interakci proteinů s ionty mědi, což jsou Biuretová metoda, Hartree-Lowryhoi (H-L) metoda, Bicinchoninová metoda. V této práci byly použity metody Biuretová, H-L a Bradfordova [12].

4.2.1 Biuretová metoda

Biuretová metoda je založena na interakci proteinů (albuminu, pankreatinu) s ionty mědi v alkalickém prostředí za vzniku chelátů. Vytváří se modrofialové zbarvení, které je detekovatelné spektrofotometrem při 550 nm. Tato metoda je relativně méně citlivá, vhodná koncentrace vzorku by měla být 1 – 10 mg proteinu v 1 ml.

Albumin, trypsin i pankreatin byly touto metodou stanoveny. Jako bílkovinný standard byla použita koncentrace 3 mg/ml. Ze standardu bylo postupně odebíráno takové množství, aby výsledná koncentrace po doplnění destilovanou vodou na 3 ml byla od $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. K takto připraveným roztokům bylo přidáno 0,3 ml biuretového činidla a po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm oproti blanku [12].

4.2.2 Hartree-Lowryho metoda

H-L je kolorimetrická metoda založená na trojsložkovém činidle. Prvníma dvěma složkami jsou ty samé jako u biuretového stanovení (obsahuje vinan sodno-draselný,

uhličitan sodný, hydroxid sodný a skalici modrou) a třetí složkou je Folin–Ciocalteu činidlo na fenoly (obsahuje polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrozinovými zbytky proteinů a barví se modře). Dle intenzity zbarvení lze stanovit koncentraci proteinu spektrofotometricky. Metoda je citlivější než biuretová, detekční limit je 0,1 – 0,6 mg/ml.

Opět byly touto metodou stanovovány všechny tři proteiny. Jako bílkovinný standard byl použit roztok o koncentraci 0,3 mg/ml. Ze standardu bylo postupně odebíráno takové množství objemu, aby po doplnění destilovanou vodou byla celková koncentrace proteinu od 0,03 do 0,15 mg/ml. K jednomu ml takto připraveného proteinu bylo přidáno H–L činidlo A, poté byly vzorky inkubovány při 50 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu, přidalo se k nim 0,1 ml H–L činidla B, nechaly se 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě, poté byly přidány 3 ml H–L činidla C a po opětovné inkubaci po dobu 10 minut ve vodní lázni o 50 °C byla změřena absorbance vzorků oproti blanku při vlnové délce 650 nm v 1 cm kyvetách [12].

4.2.3 Bradfordova metoda

Bradfordova metoda využívá Coomassie Brilliantovou modř k navázání na protein v kyselém prostředí. Po vazbě barviva dochází k barevné změně, která je přímo úměrná množství proteinu ve vzorku. Coomassie barvivo se na molekuly proteinu váže dvěma způsoby. Trifenylnmethanová skupina se váže na nepolární část proteinu a anion sulfoskupiny se váže na vedlejší řetězcové aminokyselin nesoucí kladný náboj. Bradfordova metoda je ze všech tří použitých nejcitlivější. Detekční limit je již od 0,02 – 0,1 mg/ml.

Jako bílkovinný standard albuminu, trypsinu a pankreatinu byla použita koncentrace 0,25 µg/ml. Ze standardu bylo odebíráno takové množství objemu, aby byla konečná koncentrace proteinu v rozmezí od 12,5 – 75 µg/ml. K 1 ml takto připraveného roztoku proteinu byly přidány 2 ml činidla Bradfordové a vzorek byl zamíchán. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 595 nm oproti blanku [12].

4.3 Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti

Proteiny, které obsahují tyrosin a tryptofan absorbují UV světlo v oblasti spektra kolem 280 nm. Fenylalanin absorbuje jen velmi slabě a jeho absorbance se zanedbává. Při kratších vlnových délkách, např. při 205 nm absorbují peptidové vazby [12].

4.4 Stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy

Příprava vertikální diskontinuální PAGE-SDS zahrnuje sestavení formy na polyakrylamidový gel, přípravu samotného gelu dělicího a zaostřovacího a přípravu vzorků. Nezbytná podmínka úspěšné separace jsou odmaštěná a dokonale umytá skla [12]. Pomocí sady BIORAD mini-protean se skla přichytí k sobě a vloží do stojanu. Poté se připraví dělicí gel o hustotě 14 %, na který bylo použito 2,7 ml Mili Q vody, 4,7 ml akrylamidu (Rothiphorese od firmy Roth), 2,5 ml 1,5 M pufru Tris-HCl o pH 8,8, a 0,1 ml 10% SDS a pro iniciaci polymerace bylo přidáno 50 µl 10% APS s 5 µl TEMEDu. Takto připravený gel byl pomocí pipety vpraven mezi skla asi centimetr pod okraj, na něj byla navrstvena milimetrová vrstva butanolu pro vodorovnou rovinu gelu a ponechán hodinu tuhnout. Poté byla vrstva butanolu promyta a vysušena a byl připraven 8% zaostřovací gel s 4,7 ml Mili Q vody, 2,7 ml akrylamidu (Rothiphorese od firmy Roth), 2,5 ml 0,5 M pufru Tris-HCl o pH 6,8, a 0,1 ml

10% SDS a opět pro iniciaci polymerace bylo přidáno 50 μ l 10% APS s 5 μ l TEMEDu. Gel byl nalit na dělicí gel až po okraj a do aparatury byl vložen hřebínek, gel byl opět ponechán hodinu k zatuhnutí. Poté byly skla vloženy a uchyceny do aparatury, do které se nalilo asi 800 ml 10x zředěného elektrodového pufru o pH 8,3. Dále byly připraveny vzorky pankreatinu, trypsinu, lipázy z pankreatinu a standardů ALL blue od firmy BIORAD, Color Burst (Sigma) a Servy. 0,1 g vzorku bylo dolito 1 ml Mili Q, z tohoto roztoku bylo odebráno 50 μ l a doplněno dalšími 50 μ l vzorkovacího pufru. Takto připravené vzorky byly 4 minuty povařeny a nanесeny do drážek vytvořených hřebínekem v zatuhlém gelu. Standardy byly přímo nanесeny na gel. Objem nanášeného vzorku byl od 5 – 20 μ l. Po nanесení vzorků se aparatura připojila ke zdroji stejnosměrného napětí o 100V, 400 mA na 120 minut [21].

4.5 Stanovení pH optima vybraných pankreatických enzymů

Proteinové enzymy jsou vysoce citlivé na změnu pH. Většina enzymů je aktivní jen v úzkém rozmezí pH mezi 5-9. U pankreatinu je hodnota vyšší kolem pH 7-10, jelikož se tento enzym vylučuje do dvanáctníku, kde je lehce zásadité prostředí. Hodnota pH, při kterém enzymová reakce probíhá nejrychleji, se nazývá pH optimum [12]. Závislost katalytické aktivity na koncentraci vodíkových iontů podmiňují protonovatelné skupiny, které jsou součástí aktivních center enzymů a molekul substrátů a jelikož reakce mezi enzymem a substrátem závisí na stupni jejich protonace, většina enzymů působí pouze v určité oblasti pH, mimo ni aktivita klesá [1]. Extrémní hodnoty pH mohou způsobovat ireversibilní změny struktury enzymu [12].

4.5.1 pH optimum proteázové aktivity pankreatinu

Stanovení proteázové aktivity pomocí azokaseinu

Proteázová aktivita pankreatinu pomocí substrátu azokasein je závislá na štěpení azokaseinu na azooligopeptidy rozpustné v kyselině trichloroctové, kdy nedotčené molekuly azokaseinu se v prostředí trichloroctové kyseliny vysrážejí a následně se odseparují pomocí centrifugace. Po změření absorbance centrifugovaného vzorku se z rozdílu blanku a vzorku zjistí enzymová aktivita proteáz [22].

Do sady zkumavek bylo naváženo 20 mg azokaseinu a doplněno na objem 4 ml roztokem pufrů 0,2 M hydrogenfosforečnanu sodného s 0,1 M kyselinou citronovou o pH od 3 do 8 a 4 ml roztokem pufru 0,2 M hydroxidu sodného a 0,2 M glycinu o pH 9,0 až 9,8 (viz. Tab 1).

Tab. 1: Tabulka ředění pufrů

Zkumavka	[ml]		[-]
	Kys. citronová	Na ₂ HPO ₄	
1	3,20	0,80	3
2	2,60	1,40	4
3	2,00	2,00	4,8
4	1,60	2,40	5,8
5	0,70	3,30	7
6	0,10	3,90	8
-	NaOH	Glycin	-
8	4,4	25	9
10	13,6	25	9,8

Roztoky pufrů 0,2 M NaOH s 0,1 M glycinem byly doplněny destilovanou vodou na 100 ml a z tohoto roztoku byly odebrány 4 ml do sady zkumavek [12,23].

Ze zkumavek s rozpuštěným azokaseinem bylo odebráno 100 μ l a k tomuto objemu přidáno dalších 100 μ l roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Takto připravené roztoky byly inkubovány po dobu 45 minut při 30 °C. Blank byl připraven identicky, jen je kyselina trichloroctová přidala okamžitě po přidavku roztoku enzymu k zastavení enzymatické reakce. Po inkubaci se do všech vzorků přidalo 410 μ l trichloroctové kyseliny a roztoky byly zcentrifugovány při 10 000 otáčkách po 10 minut. Po centrifugaci byla změřena absorbance při 440 nm, kdy se do kyvety nepipetovalo 500 μ l centrifugovaného roztoku a 600 μ l 1M NaOH.

Stanovení proteázové aktivity pomocí albuminu

Proteázová aktivita pankreatinu pomocí albuminu je závislá na štěpení tohoto substrátu na jednotlivé aminokyseliny rozpustné v kyselině trichloroctové, kdy se nehydrolyzované molekuly albuminu vysrážejí a je možné je oddělit pomocí centrifugace. Po změření absorbance při vlnové délce 280 nm, kdy absorbují aromatické aminokyseliny tyrosin a tryptofan, se z rozdílu blanku a vzorku zjistí enzymová aktivita proteáz.

Postup byl identický jako u azokaseinu, jen s použitím albuminu. Absorbance byla měřena při 280 nm, bez přidavku 1M NaOH.

4.5.2 pH optimum amylázové aktivity pankreatinu

PH optimum amylázové aktivity pankreatinu se určuje štěpením škrobu amylasou. Stupeň štěpení polysacharidu určujeme jednak orientační reakcí s jodem a jednak kvantitativně z přírůstku redukujících cukrů metodou podle Somogyi-Nelsona [12].

Do sady zkumavek byly napipetovány 4 ml roztoků pufrů o pH od 3 do 9,8, stejně jako u pH optima proteázové aktivity a pufru 0,2 M hydroxidu sodného s 0,2 M hydrogenfosforečnem sodným o pH 11,5 podle následující tabulky:

Tab 2: Příprava nových pufrů pro pH optimum amylázy

Zkumavka	[ml]		[-]
	Kys. citronová	Na ₂ HPO ₄	pH
1	0,00	4,00	8,3
-	NaOH	Na ₂ HPO ₄	-
2	11,1	0,2	11,5

Roztok pufru NaOH s hydrogenfosforečnanem sodným byly doplněny destilovanou vodou na 100 ml a z tohoto roztoku byly odebrány 4 ml do zkumavky [12,23,26].

Do všech zkumavek byl odměřen 1 ml 1% škrobu a poté byl přidán 1 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml a vzorky byly ponechány po dobu 1 hodiny při teplotě 30 °C. Poté byl z každého vzorku odebrán do čisté zkumavky 1 ml vzorku. Do každé zkumavky se vzorkem bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I (24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g bezvodého Na₂SO₄ a 12 g vinanu sodno-draselného neboli Seignettova sůl v 800 ml destilované vody) a II (4 g CuSO₄.5 H₂O a 24 g bezvodého Na₂SO₄ v 200 ml destilované vody). Zkumavky byly umístěny do vroucí vodní lázně a vařily se 10 minut. Poté byly zkumavky ochlazené vodou, přidalo se 0,5 ml činidla III (25 g molybdenanu amonného v 450 ml vody a 21 ml koncentrované H₂SO₄, poté přidáno 3 g Na₂HasO₄.7 H₂O

v 25 ml vody) a zkumavky byly promíchány, dokud se vzniklý Cu_2O nerozpustil. Po doplnění objemu na 10 ml byla změřena absorbance oproti slepému vzorku při 720 nm [12].

4.5.3 pH optimum lipázové aktivity pankreatinu

Princip metody spočívá v použití p-nitrofenylpalmitátu jako substrátu, kdy pomocí lipolytických enzymů se substrát hydrolyticky štěpí na p-nitrofenol (PNF), který je barevný a jeho množství ve vzorku se určuje spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm [27].

Nejdříve byl připraven pufr od pH 3 - 9,8 dle Tab. 1, poté byl připraven roztok substrátu, kdy 25 mg nitrofenylpalmitátu bylo rozpuštěno ve 20 ml etanolu. Na destičku pro měření na přístroji ELISA reader bylo napipetováno 230 μl pufru, k tomuto objemu bylo přidáno 50 μl substrátu a reakce byla iniciována 50 μl roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Pomocí ELISA readeru byla proměřena absorbance vzorku při 405 nm po minutových intervalech po dobu 10 minut [27].

4.6 Stanovení teplotní aktivity pankreatinu

Rychlost enzymových reakcí je také závislá na teplotě. S rostoucí teplotou vzrůstá i enzymová aktivita současně ale dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace bílkoviny. Výsledkem těchto dvou protichůdných jevů je teplotní optimum. Poloha maxima je dána termolabilitou enzymu, které je u živočišných enzymů kolem 50 až 60 °C a dobou měření, tedy když se měří teplotní optimum kratší dobu, proces tepelné inaktivace se téměř neuplatní a naměřená optimální teplota bude vyšší [1].

Principy všech tří složek aktivit pankreatinu jsou identické. Jedinou obměnou je postup, kdy z výsledků pH optim byla pro stanovení ideální teploty použita nejvýhodnější hodnota pH, při které enzym vykazoval nejvyšší aktivitu.

4.6.1 Teplotní optimum proteázové aktivity pankreatinu

Proteázová aktivita pankreatinu byla proměřena už jen se substrátem albuminem. Do sady zkumavek bylo naváženo 20 mg albuminu a doplněno na objem 4 ml roztokem pufru o pH 9,8 (ředění pufru viz. Tab. 1.). Z tohoto roztoku bylo odebráno 100 μl a smícháno se 100 μl roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Roztoky byly inkubovány 45 minut při 30, 40, 50, 60 a 70 °C. Blank byl připraven identicky, kyselina trichloroctová byla přidána okamžitě po přidavku roztoku enzymu. Po inkubaci se do vzorku přidalo 410 μl trichloroctové kyseliny a roztok byl zcentrifugován při 10 000 otáčkách po 10 minut. Po centrifugaci byla změřena absorbance při 280 nm.

4.6.2 Teplotní optimum amylázové aktivity pankreatinu

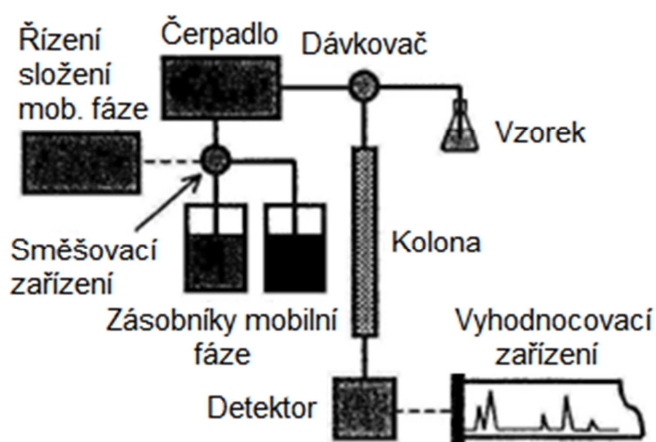
Do zkumavky byly napipetovány 4 ml roztoku pufru o pH 7. Do všech zkumavek byl odměřen 1 ml 1% škrobu a poté byl přidán 1 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml a vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 30, 40, 50, 60 a 70 °C. Po inkubaci byl ze vzorku odebrán 1 ml vzorku, k němu přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II. Zkumavky byly inkubovány 10 minut ve vroucí vodní lázni, poté byly ochlazeny vodou a přidalo se 0,5 ml činidla III, obsah byl promíchán po doplnění objemu na 10 ml byla změřena absorbance oproti slepému vzorku při 720 nm [12].

4.6.3 Teplotní optimum lipázové aktivity pankreatinu

Nejdříve byl připraven pufr o pH 7 dle Tab. 1, poté byl připraven roztok substrátu (25 mg nitrofenylpalmitátu ve 20 ml etanolu). Do sady zkumavek bylo napipetováno 0,92 ml pufru a k němu přimícháno 0,01 ml substrátu, iniciace reakce byla započata přidavkem 0,01 ml roztoku pankreatinu o koncentraci 4 mg/ml. Zkumavky byly inkubovány při 30, 40, 50, 60 a 70 °C po dobu 30 minut. Ihned poté byla změřena absorbance roztoků při 405 nm [27].

4.7 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a o separaci složek rozhodují nejen interakce se stacionární fází, ale i vhodně zvolená mobilní fáze. Kolona je naplněná stacionární fází, která je promývána mobilní fází (eluent). Vzorek se dávkuje na horní vrstvu stacionární fáze [14].



Obr. 11: Schéma kapalinového chromatografu [14]

4.7.1 Iontoměničová LPLC

Při iontoměničové LPLC byla použita menší náplňová kolona o velikosti 20 cm a průměru 1 cm. Jako stacionární fáze byla použita DEAE-Sephadex A-25, která sahala v koloně do 6,5 cm, mobilní fáze byl 20 mM Tris-HCl pufr o pH 8,3 a poté směšován s 50 mM pufrům o stejném pH s 1 M NaCl. Dávkování vzorku bylo provedeno pomocí čerpadla. Průtok byl nastaven na 0,5 ml za minutu a v jednotlivých frakcích byly měřeny jednotlivé enzymové aktivity při optimálním pH a teplotě stejným způsobem jak v předchozích případech.

4.7.2 Gelová LPLC

Při gelové filtraci byla použita větší náplňová kolona o velikosti 27 cm a průměru 2 cm. Jako stacionární fáze byl použit Sephadex G-200, který sahal až do výše 17,5 cm, mobilní fáze byl 50 mM fosfátový pufr o pH 8,8. Průtok byl nastaven na 0,5 ml. Vzorek byl porovnán s identicky provedenou gelovou filtrací standardu.

4.8 Enkapsulace pankreatinu do lipozomů pomocí ultrazvuku

Principem enkapsulace do lipozomů je vytvoření roztoku fosfolipidů s molekulami látky vybrané k enkapsulaci. Fosfolipidy se pomocí působení ultrazvuku sbalí, a tak uzavřou do meziprostoru molekuly látky z roztoku. Zjištění enkapsulační účinnosti se provádí pomocí

rozdílu koncentrace původního roztoku enkapsulované látky a koncentrace látky v roztoku po enkapsulaci pomocí spektrofotometrického stanovení, kdy je po centrifugaci v supernatantu zjišťována koncentrace volných molekul enzymu vhodnou metodou.

Pro enkapsulaci pankreatinu byl vybrán lecitin s cholesterolem v poměru 9:1 se vzestupnou koncentrací 25, 100, 200 a 500 mg ve 20 ml roztoku enzymu o koncentraci 0,5 mg/ml. Takto namíchané roztoky byly po dobu jedné minuty ultravukovány, poté centrifugovány po dobu 30 minut na 14 000 otáček. Z takto připraveného roztoku byla zjišťována koncentrace volných molekul enzymu nacházející se v supernatantu metodou H-L identicky jako při stanovování kalibrační křivky.

4.8.1 Stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu

Z enkapsulovaného vzorku, připraveného viz. Enkapsulace pankreatinu do liposomů pomocí ultrazvuku, byl odlit supernatant obsahující volné molekuly enzymu. K usazenině sbalených enzymů v lecitinu byl nalit 1 ml pufru o pH 9,8 (optimální hodnota pro proteázovou aktivitu) a při teplotě 50 °C byl inkubován po dobu 1 hodiny. Poté byl roztok opět centrifugován po dobu 30 minut při 14 000 otáčkách, aby v supernatantu zbyly pouze molekuly enzymu uvolněných ze struktury liposomů. Ze supernatantu byla zjišťována proteázová aktivita stejným způsobem jako v předchozích případech. Bylo použito pH 9,8 a teplota 50 °C. Absorbance byla měřena při 280 nm.

4.8.2 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí

Enzym fosfolipáza byl nalezen v řadě rostlin, jako jsou mrkev, španát, zelí nebo i cukrová řepa a jiné. Největší množství je ho však zastoupeno v brukvovitých rostlinách a pro jeho aktivitu jsou nezbytné vápenaté ionty. Fosfolipázy působí na fosfolipidy a výrazně mění jejich náboje. V zelí je obsažena fosfolipáza D, která hydrolyzuje lecitin na kyselinu fosfatidovou a tím uvolní enzymy z fosfolipidového obalu [12].

Z enkapsulovaného vzorku, připraveného viz. Enkapsulace pankreatinu do liposomů pomocí ultrazvuku, byl odlit supernatant obsahující neenkapsulované molekuly enzymu. K usazenině byl napipetován 1 ml roztoku fosfolipázy D (6 g listů s 20 ml pufru Gly-NaOH o pH 9,8 s 1,94 g CaCl_2) a tento roztok byl inkubován po dobu 1 hodiny při 50 °C a poté centrifugován při 14 000 otáčkách po dobu 30 minut stejně jak v minulém případě. Ze supernatantu byla zjišťována proteázová aktivita, která byla také stanovována i v samotném roztoku fosfolipázy D.

4.9 Stanovení distribuce velikosti částic a zeta potenciálu

Pomocí přístroje DLS Malvern Zeta sizer ZS byly proměřeny distribuce velikosti částic a jejich stability pomocí zeta potenciálu. Vzorky byly před měřením rozděleny a u první skupiny vzorků byl použit membránový extrudér, což je přístroj, který sjednocuje velikosti liposomů pomocí filtrování vzorku přes membránu s definovanou velikostí pórů, a u druhé skupiny vzorků membránový extrudér použit nebyl.

Připravené vzorky byly nepipetovány do kyvety, v případě vysoké koncentrace molekul ve vzorku naředěny přefiltrovanou destilovanou vodou. Kyveta byla vložena do DLS přístroje a přístroj následně vyhodnotil distribuci velikosti částic. Ve stejném vzorku byl zjištěn i zeta potenciál vložení speciální „deep“ cely do kyvety obsahující roztok liposomů [18].

5 Výsledky

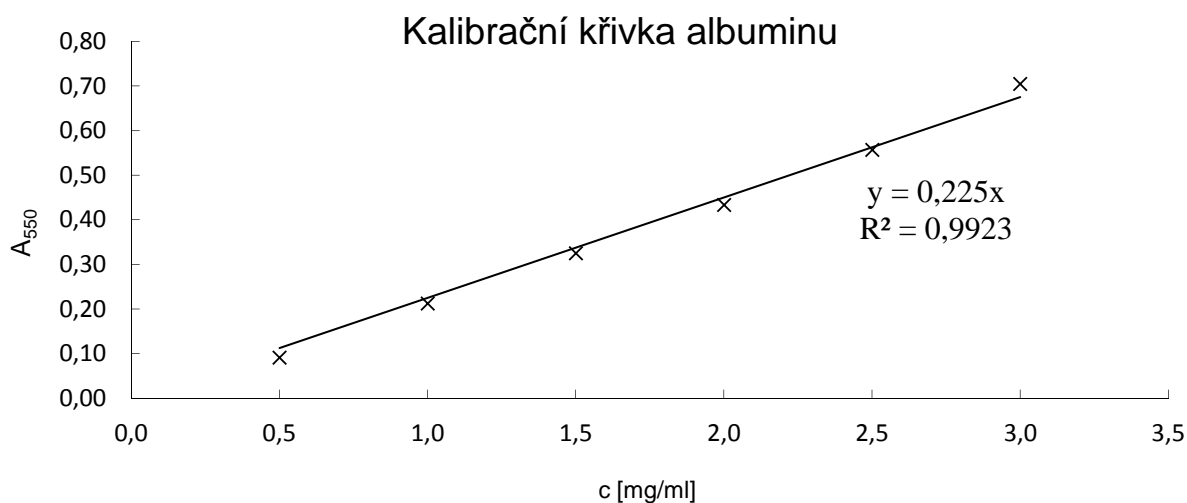
5.1 Výsledky stanovení koncentrace proteinů

5.1.1 Biuretová metoda

Kalibrační závislost koncentrace proteinu na absorbanci při 550 nm pro albumin a pankreatin, kde z bílkovinného standardu o koncentraci 3 mg/ml byl postupně odebírán takový objem, aby se koncentrace výsledného roztoku proteinu lineárně zvyšovala.

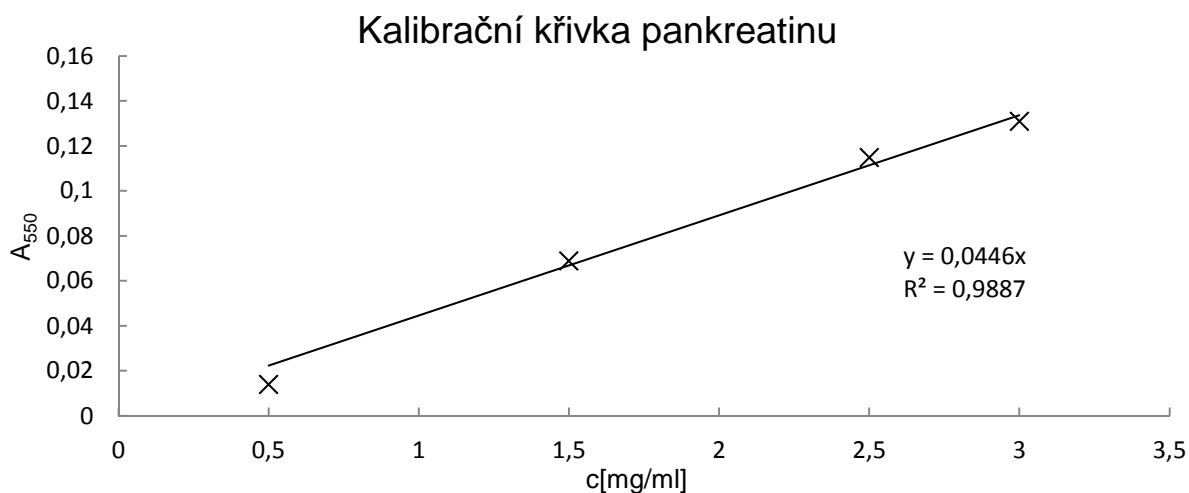
Tab. 3: Ředění roztoků a naměřené hodnoty absorbance pro albumin a pankreatin

	[mg/ml]	[ml]		[mg/ml]	albumin	pankreatin
	C _{stand.}	V _{stand.}	V _{voda}	c	A	A
1	3	0,5	2,5	0,50	0,091	0,014
2		1,0	2,0	1,00	0,2125	-
3		1,5	1,5	1,50	0,325	0,069
4		2,0	1,0	2,00	0,4335	-
5		2,5	0,5	2,50	0,557	0,115
6		3,0	0,0	3,00	0,705	0,131



Graf 1: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 550 nm

V grafu je uvedena regresní přímka, která udává závislost koncentrace albuminu na absorbanci, která je popsána rovnicí: $y = 0,225x$.



Graf 2: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 550 nm

Pravděpodobně v důsledku omezené rozpustnosti pankreatinu došlo k fluktuaci, a tudíž nebylo možné některé body zahrnout do kalibrační křivky.

Enzym trypsin nebylo možné touto metodou stanovit.

5.1.2 Hartree – Lowryho metoda

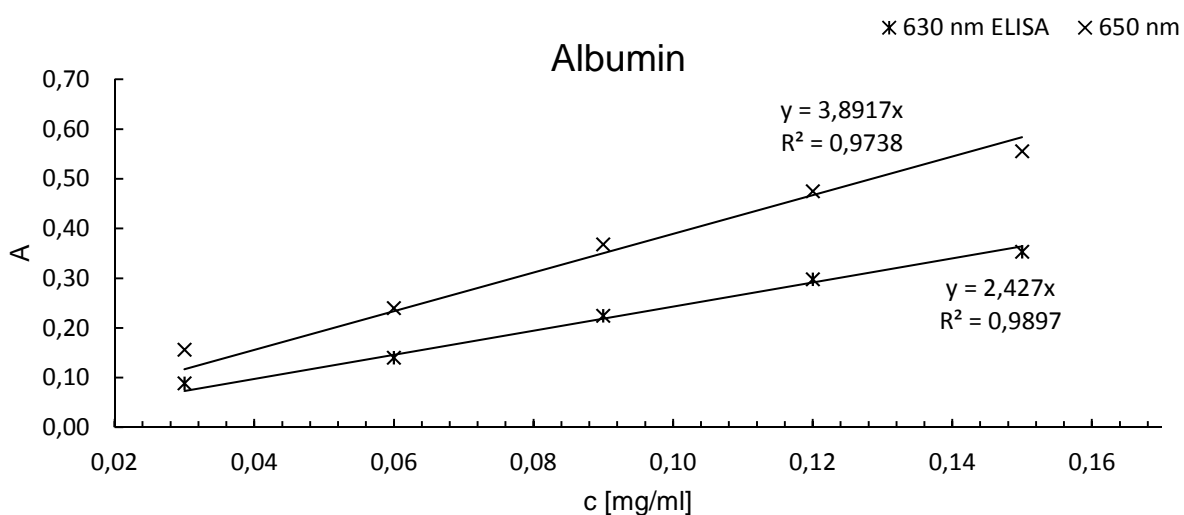
Tato metoda byla vyzkoušena pomocí Nanophotometru i ELISA reader na albuminu, trypsinu a pankreatinu. Opět jak u Biuretové metody jsou kalibrační křivky závislé na lineárně se zvyšující koncentraci při určité absorbanci. U nanophotometru je absorbance při 650 nm, u ELISA readeru při 630 nm. Obě koncovky byly vzájemně porovnány.

Tab. 4: Ředění roztoků pro albumin, trypsin a pankreatin

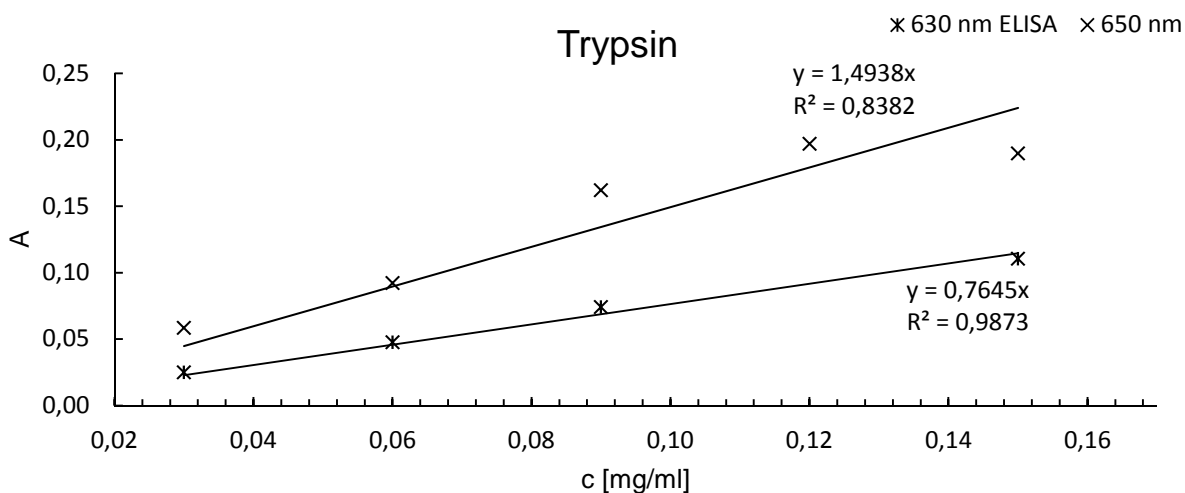
	[mg/ml]	[ml]	[mg/ml]	[-]
	$C_{\text{stand.}}$	$V_{\text{stand.}}$	V_{voda}	C_{vz}
1	0,3	0,1	0,9	0,03
2		0,2	0,8	0,06
3		0,3	0,7	0,09
4		0,4	0,6	0,12
5		0,5	0,5	0,15

Tab. 5: Naměřené hodnoty absorbance při různé koncentraci pro nanophotometr a ELISA readeru

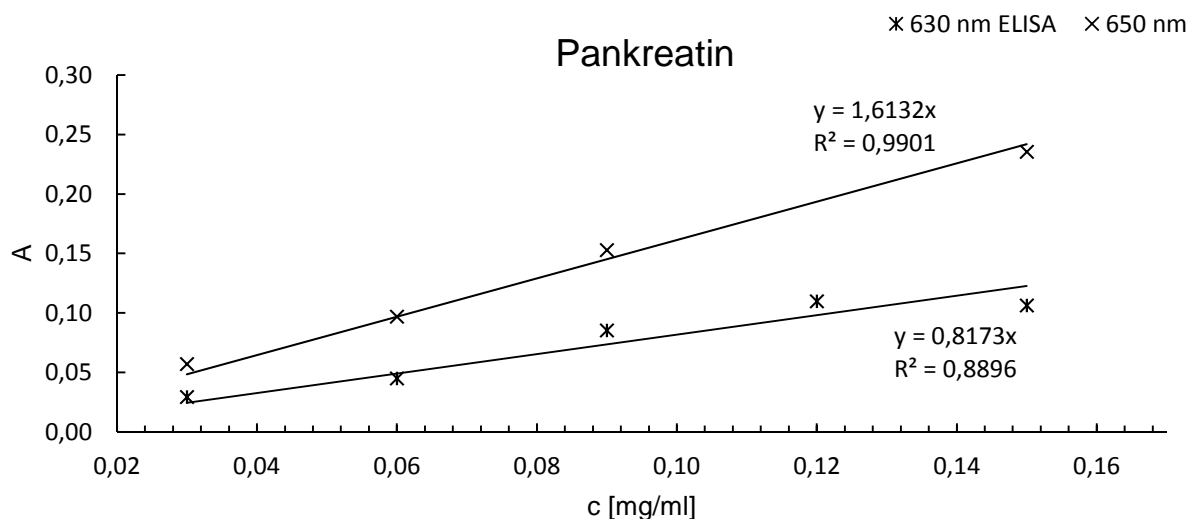
Nanophotometr x ELISA READER	1	2	3	4	5
albumin c[mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0890	0,1405	0,2250	0,2980	0,3535
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,1563	0,2400	0,3685	0,4755	0,5555
trypsin c [mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0250	0,0475	0,0740	-	0,1105
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,0585	0,0920	0,1620	0,1970	0,1897
pankreatin c [mg/ml]	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15
ELISA READER - 630 nm	0,0295	0,0450	0,0855	0,1100	0,1065
NANOPHOTOMETER - 650 nm	0,0570	0,0970	0,1530	-	0,2355



Graf 3: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace albuminu na absorbanci při 650 nm na nanophotometru a při 630 nm na ELISA readeru



Graf 4: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace trypsinu na absorbanci při 650 nm na nanophotometru a při 630 nm na ELISA readeru



Graf 5: Porovnání kalibrační závislosti koncentrace pankreatinu na absorbanci při 650 nm na nanofotometru a při 630 nm na ELISA readeru

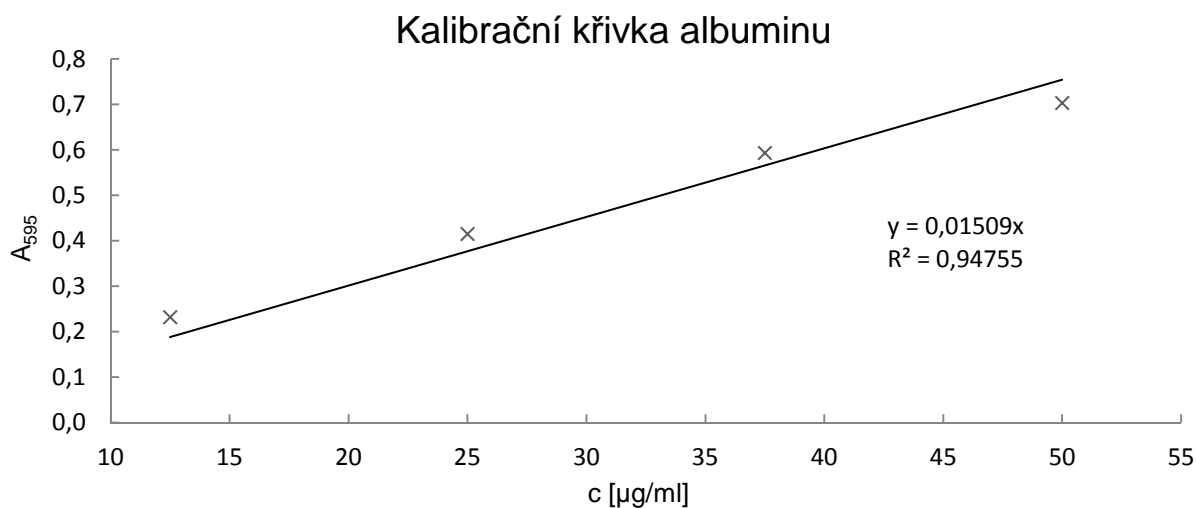
Jelikož ELISA reader nemá možnost měřit absorbanci vzorku při 650 nm, kde má protein při H-L metodě absorpční maximum, musela se absorbance změřit při 630 nm, proto má regresní přímka ELISA readeru znatelně menší směrnici a tedy i citlivost než u nanofotometru. Na druhou stranu je použití ELISA readeru výhodou při analýze velkého množství vzorků.

5.1.3 Bradfordova metoda

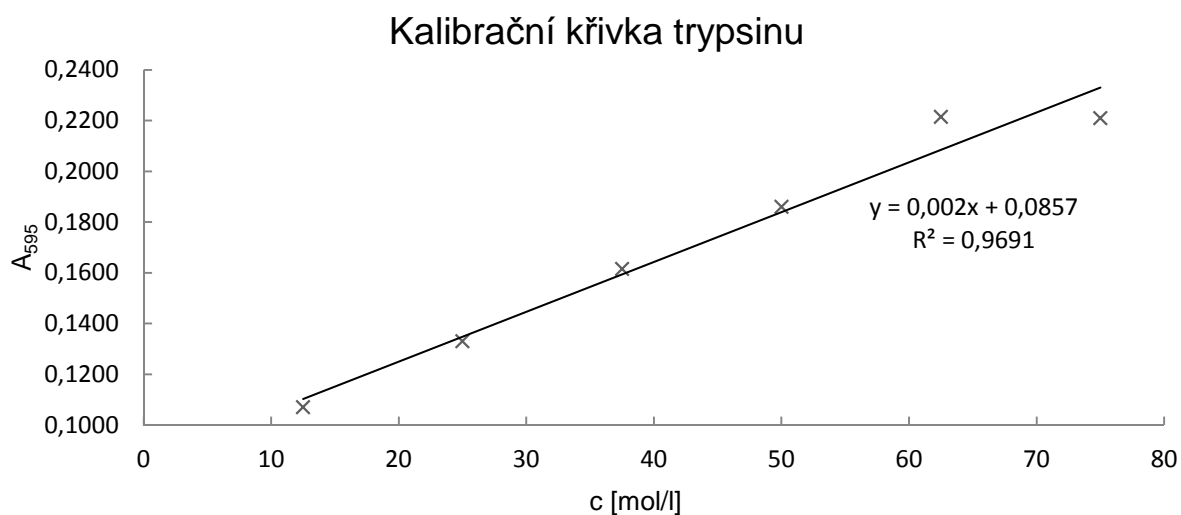
Stejně jako v předchozích případech byla tato metoda použita pro albumin, trypsin i pankreatin. Absorbční maximum je u této metody 595 nm.

Tab. 6: Ředění roztoků a naměřené hodnoty absorbance pro albumin, trypsin a pankreatin

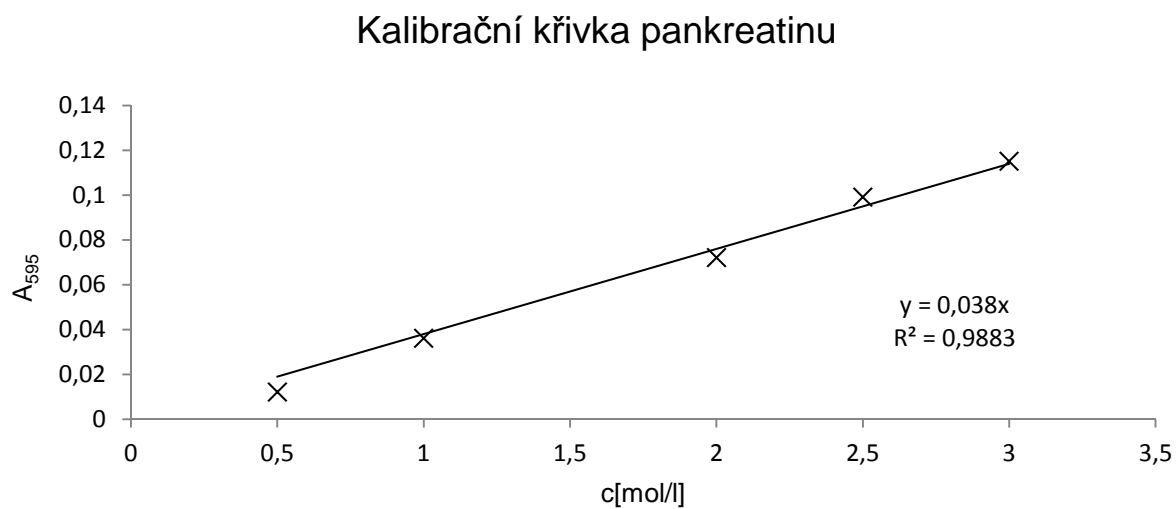
	[mg/ml]	[ml]		[μg/ml]	albumin	trypsin	pankreatin
	$C_{\text{stand.}}$	$V_{\text{stand.}}$	V_{voda}	c	A_{595}	A_{595}	A_{595}
1	0,25	0,05	0,95	12,5	0,2323	0,1070	0,012
2		0,1	0,9	25	0,4157	0,1330	0,036
3		0,15	0,85	37,5	0,5933	0,1615	-
4		0,2	0,8	50	0,7037	0,1860	0,072
5		0,25	0,75	62,5	-	0,2215	0,099
6		0,3	0,7	75	-	0,2210	0,115



Graf 6: Kalibrační závislost koncentrace albuminu na absorbanci při 595 nm



Graf 7: Kalibrační závislost koncentrace trypsinu na absorbanci při 595 nm

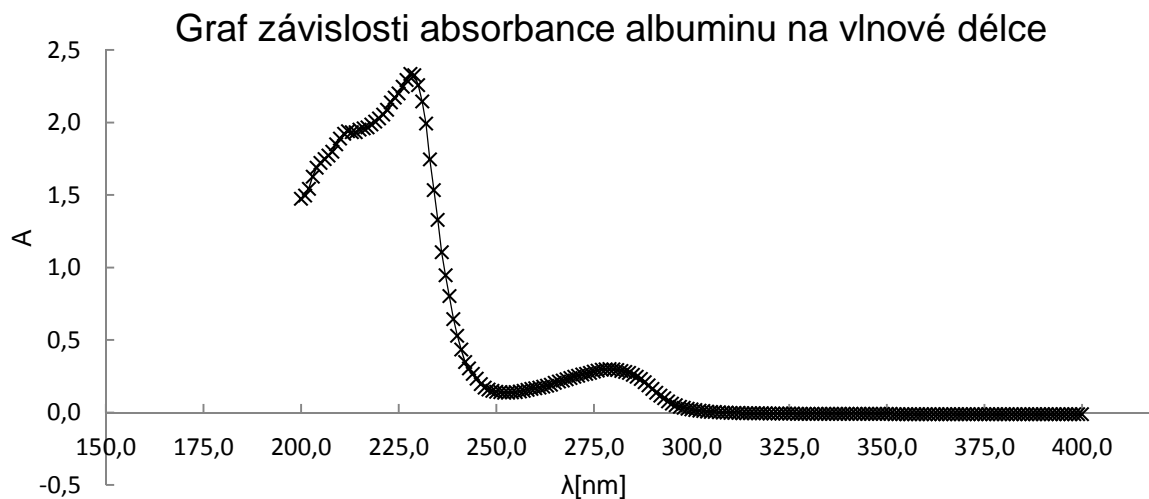


Graf 8: Kalibrační závislost koncentrace pankreatinu na absorbanci při 595 nm

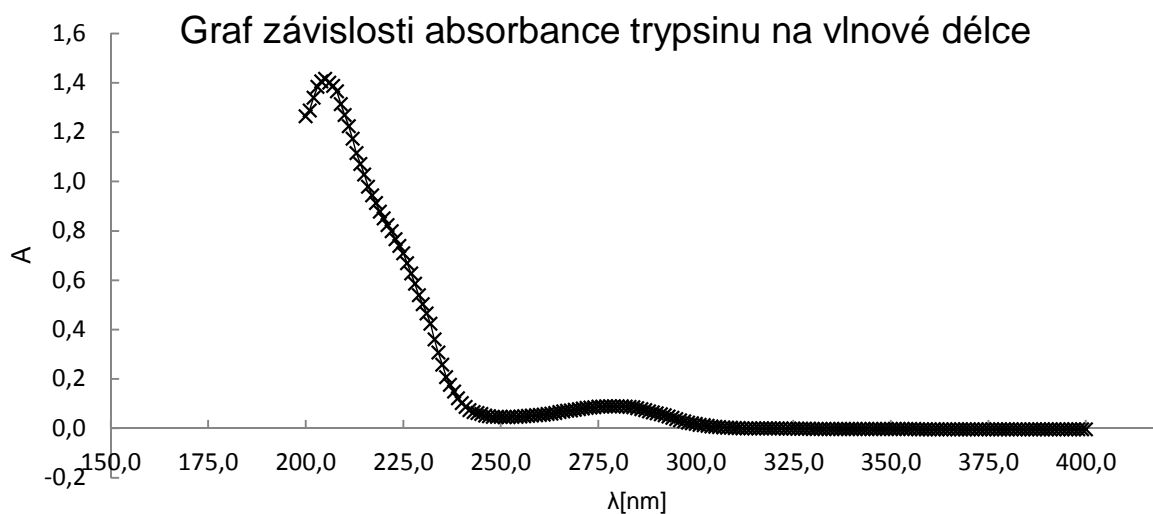
U kalibrační křivky pankreatinu u došlo u jedné hodnoty ke fluktuaci, tato hodnota tedy nebyla zahrnuta do grafu.

5.2 Absorpční spektra vybraných proteinů

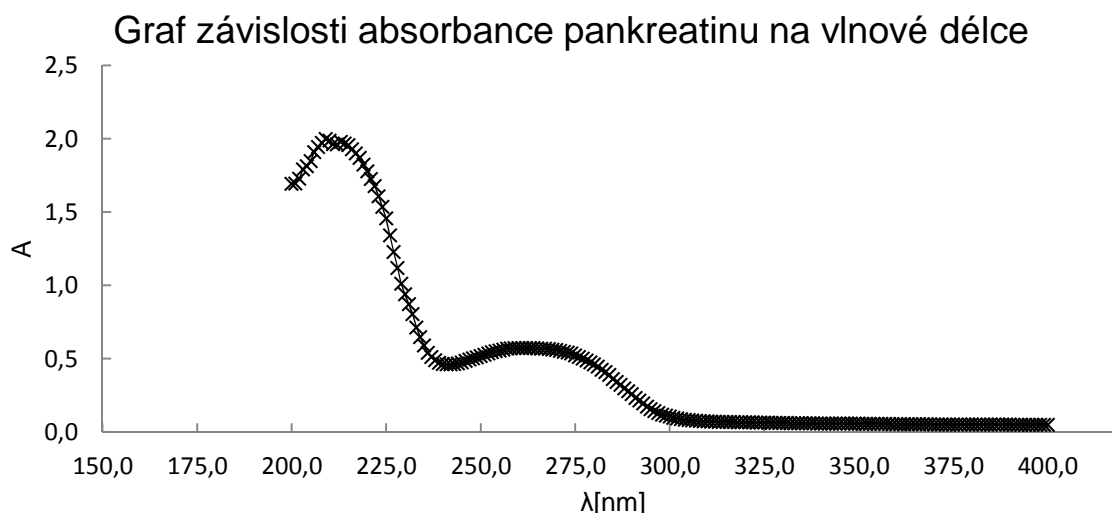
UV profil albuminu, trypsinu a pankreatinu od 150 nm do 400 nm.



Graf 9: Absorpční spektrum albuminu v UV oblasti



Graf 10: Absorpční spektrum trypsinu v UV oblasti

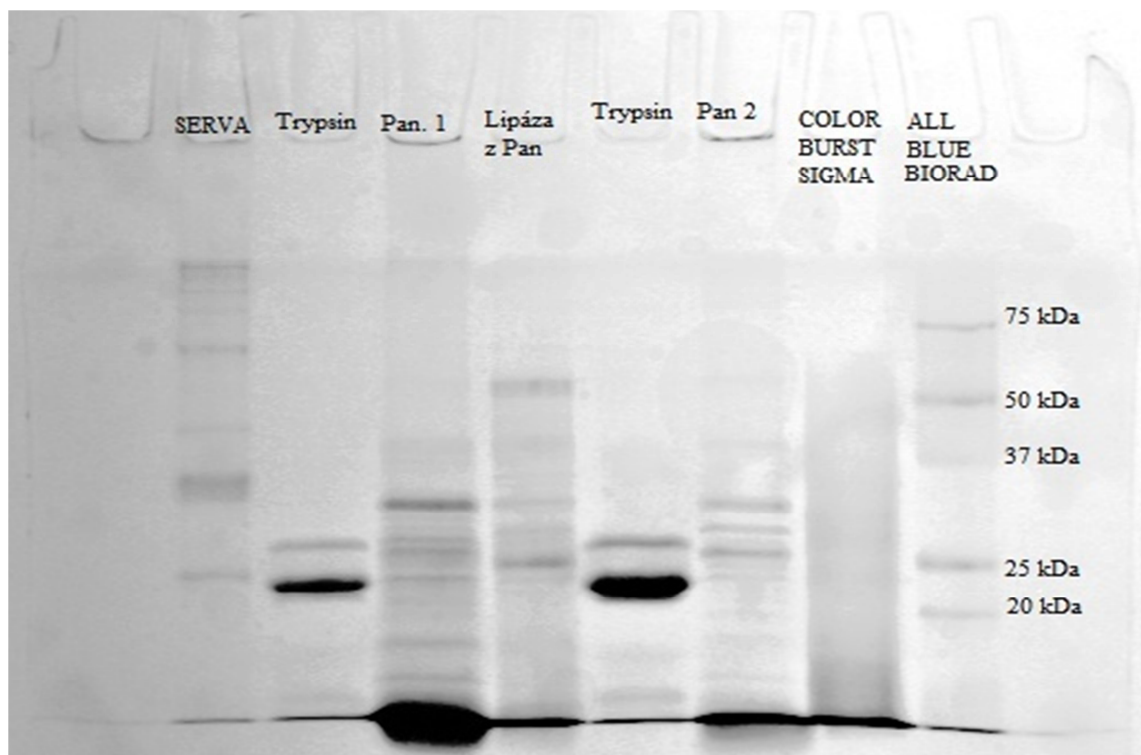


Graf 11: Absorpční spektrum pankreatinu v UV oblasti

Z výsledků je patrné, že jednotlivé vzorky se od sebe příliš neliší, první absorpční maximum je okolo 205 nm, kde absorbují peptidické vazby, při druhém maximu absorpci aromatických aminokyselin se vlnová délka pohybovala v rozmezí okolo 270-280 nm.

5.3 Výsledky stanovení velikosti proteinů pomocí elektroforézy

Elektroforéza byla provedena v diskontinuálním provedení, kdy jako zaostřovací gel byl použit gel o koncentraci 7%, separační gel pak měl koncentraci 14% akrylamidu.



Obr. 12: PAGE-SDS s popisky látek a velikostí standardu.

Z obr. 12 je zřejmé, že pankreatin obsahuje řadu složek velikostně v rozmezí od cca 10 kDa po 37 kDa. U vzorku Pan 2 je navíc patrná zóna odpovídající molekulové hmotnosti

cca 50 kDa, která je také patrná u pankreatické lipázy. Molekulové hmotnosti pankreatických lipáz se podle některých pramenů pohybuje okolo 51 kDa [29], jiné pak uvádějí hodnotu 59 kDa [30]. Je tedy pravděpodobné, že právě zóna odpovídající velikosti 50 kDa přísluší právě pankreatické lipáze. Také enzym trypsin (23 kDa) je ve vzorku pankreatinu jasně patrný.

5.4 Výsledky stanovení enzymových aktivit pankreatinu v různém pH

5.4.1 Proteázová aktivita pankreatinu

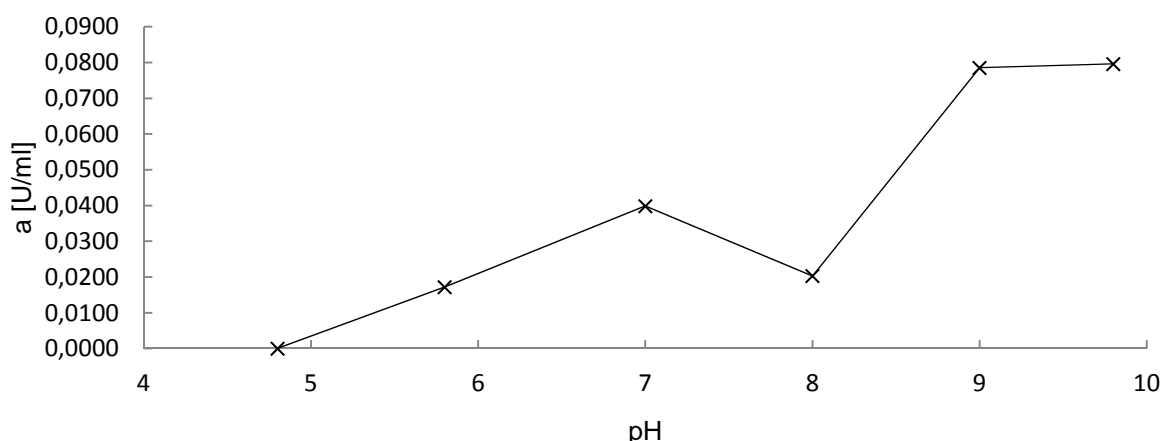
Tato metoda byla provedena pomocí dvou odlišných substrátů, a to s azokaseinem a poté s albuminem.

Proteázová aktivita byla následně vypočítána dle vzorce $a = \frac{A}{t} \cdot 10$, kde A je absorbance, t je počet minut inkubace v termostatu a 10 je přepočet 0,1 ml na 1 ml.

Tab 7:Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu na 1ml

AZOKASEIN					
[-]					[U/ml]
pH	A ₄₄₀			Průměr	$\frac{A}{t} \cdot 10$
4,8	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
5,8	0,067	0,1	0,065	0,0773	0,0172
7	0,168	0,177	0,193	0,1793	0,0399
8	0,108	0,087	0,079	0,0913	0,0203
9	0,351	0,366	0,343	0,3533	0,0785
9,8	0,363	0,346	0,366	0,3583	0,0796

Graf závislosti proteázové aktivity na pH



Graf 12: pH profil proteolytické aktivity pankreatinu se substrátem azokaseinem

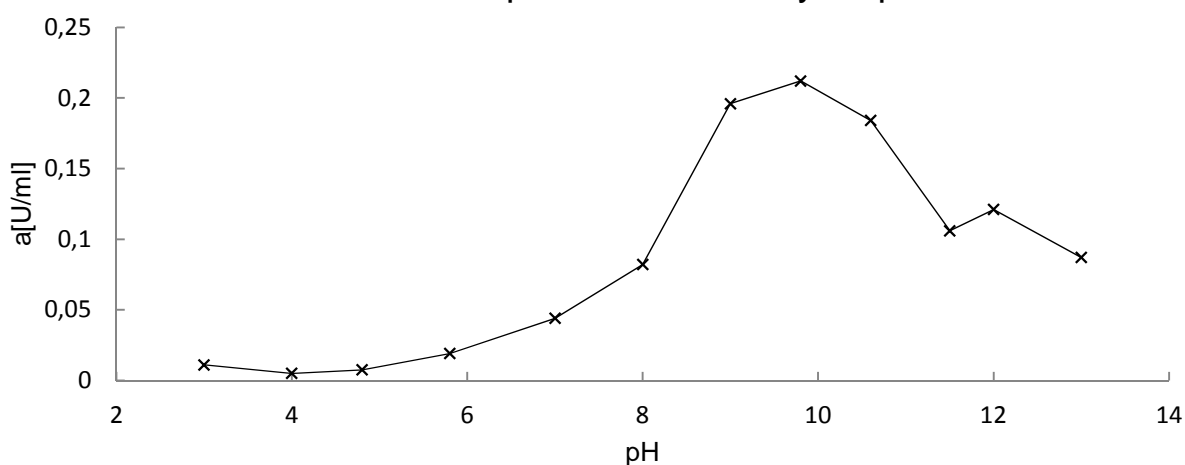
Výsledky tohoto experimentu byly pravděpodobně ovlivněny tou skutečností, že intenzita zabarvení azokaseinu je silně závislá na pH, přičemž roste s vyšší alkalitou prostředí. Proto

byl v dalším experimentu změněn substrát z azokaseinu na albumin, který nemění barvu v závislosti na pH a navíc je také lépe rozpustný v kyselém prostředí.

Tab.8: Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu na 1ml

albumin:		[U/ml]
pH	A	$\frac{A}{t} \cdot 10$
3	0,011	0,0024
4	0,005	0,0011
4,8	0,0075	0,0017
5,8	0,019	0,0042
7	0,044	0,0098
8	0,082	0,0182
9	0,196	0,0436
9,8	0,212	0,0471
10,6	0,184	0,0409
11,5	0,106	0,0236
12	0,121	0,0269
13	0,087	0,0193

Graf závislosti proteázové aktivity na pH



Graf 13: pH profil proteolytické aktivity pankreatinu se substrátem albuminem

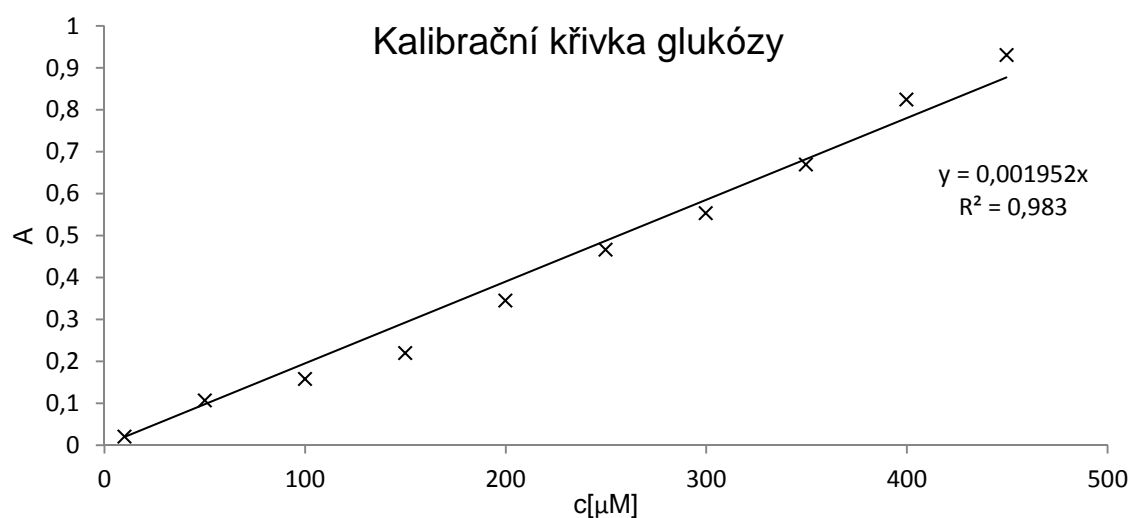
Je zjevné, že v případě použití jiného substrátu, v tomto případě albuminu je pH profil čitelnější a jasně z něj vyplývá, že pH optimum je okolo pH 10. V případě azokaseinu nelze věrohodně určit optimální pH, při kterém má enzym nejvyšší aktivitu.

5.4.2 Amylázová aktivita pankreatinu

Amylázová aktivita pankreatinu se určovala pomocí substrátu, kterým byl v našem případě 1% škrob. Pro výpočet amylázové aktivity je potřeba znát kalibrační křivku glukózy, ze které byla vypočítána koncentrace substrátu ($y=0,001952 \cdot x$), která se přepočítala na rozdíl látkového množství pomocí vzorce $n=c \cdot V$ a tato hodnota byla vydělena dobou, po kterou byla měřena absorbance a faktorem přepočítávajícím aktivitu na aktivitu na ml.

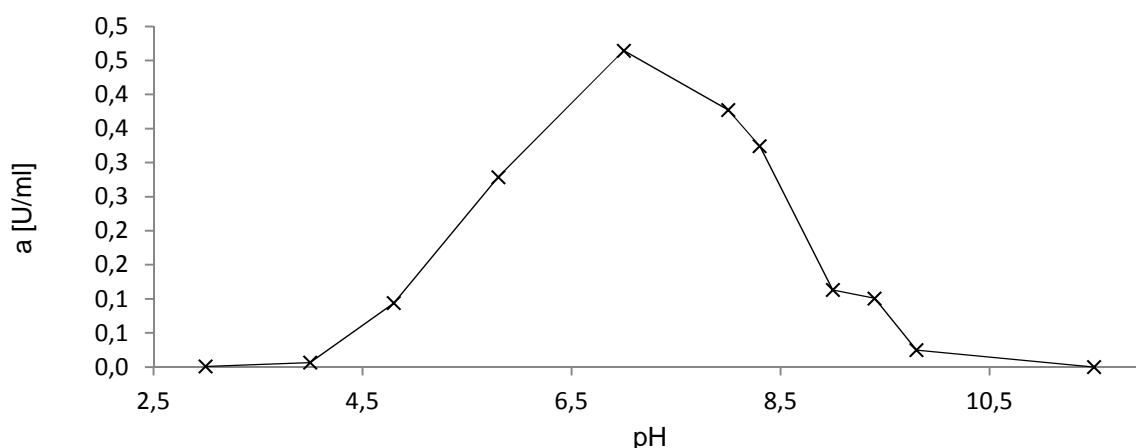
Tab. 9: Data pro kalibrační křivku glukózy

c (g/l)	c (μmol/l)	A 720 nm
0,0018	9,9913963	0,021
0,009	49,956981	0,107
0,018	99,913963	0,158
0,027	149,87094	0,22
0,036	199,82793	0,345
0,045	249,78491	0,467
0,054	299,74189	0,554
0,063	349,69887	0,67
0,072	399,65585	0,825
0,081	449,61283	0,931

**Graf 14:** Kalibrační závislost absorbance na koncentraci glukózy v roztoku**Tab. 10:** Data absorbance a přepočet na enzymovou aktivitu

	[-]			[U/ml]
pH:	A	A	průměr	a
3	0,002	0,000	0,001	0,0009
4	0,015	0,000	0,008	0,0064
4,8	0,177	0,043	0,110	0,0939
5,8	0,191	0,462	0,327	0,2788
7	0,583	0,505	0,544	0,4645
8	0,438	0,446	0,442	0,3774
8,3	0,392	0,368	0,380	0,3245
9	0,189	0,076	0,133	0,1131
9,4	0,119	0,117	0,118	0,1008
9,8	0,000	0,058	0,029	0,0248
11,5	0,000	0,000	0,000	0,0000

Graf závislosti amylázové aktivity na pH



Graf 15: pH profil pankreatinu se substrátem škrob

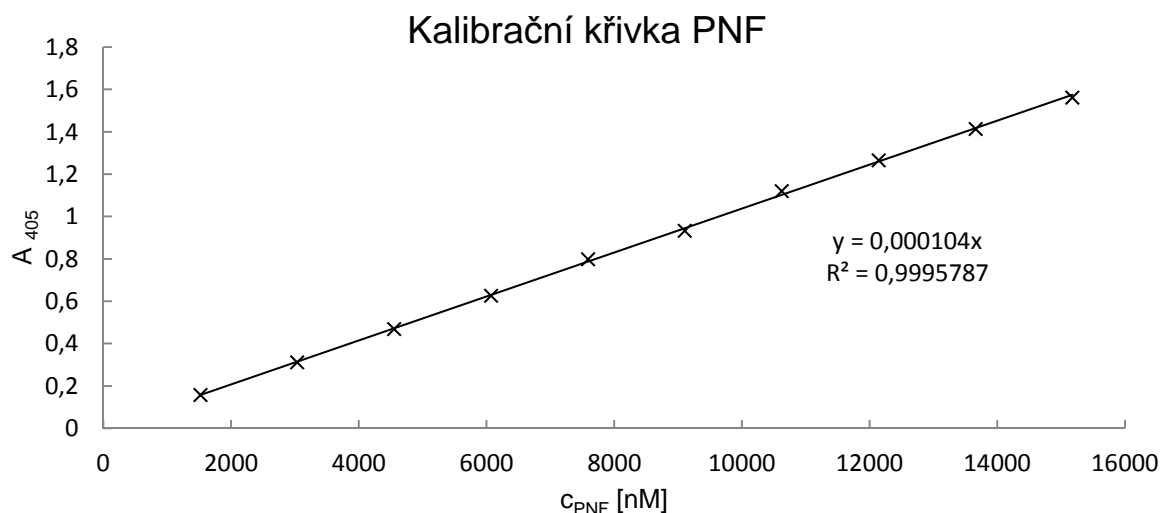
Z grafu je patrné, že amylázová aktivita má jasné maximum v pH=7.

5.4.3 Lipázová aktivita pankreatinu

Lipázová aktivita byla měřena pomocí přístroje ELISA reader, za použití substrátu nitrofenylpalmitátu, kde bylo zapotřebí nejprve změřit kalibrační křivku, která je potřebná k následnému výpočtu lipázové aktivity. Výpočet lipázové aktivity byl následující: Z rozdílu absorbancí byla vypočítána změna koncentrace substrátu ($y=0,000104 \cdot x$), která se přepočítala na rozdíl látkového množství pomocí vzorce $n=c \cdot V$ a tato hodnota byla vydělena dobou, po kterou byla měřena absorbance a tato hodnota přepočítána na 1 ml roztoku.

Tab. 11: Hodnoty kalibrační křivky PNF

	[ul]		[mM]	[-]	[nM]
	PNF	pufr	c	A_{405}	c
1	25	255	0,015	0,158	1517,9
2	50	230	0,030	0,313	3035,7
3	75	205	0,046	0,469	4553,6
4	100	180	0,061	0,627	6071,4
5	125	155	0,076	0,799	7589,3
6	150	130	0,091	0,933	9107,1
7	175	105	0,106	1,121	10625,0
8	200	80	0,121	1,266	12142,9
9	225	55	0,137	1,414	13660,7
10	250	30	0,152	1,562	15178,6



Graf 16: Kalibrační závislost koncentrace PNF na absorbanci při 405 nm

Tab. 12-13: Hodnoty absorbancí pro všechny pH

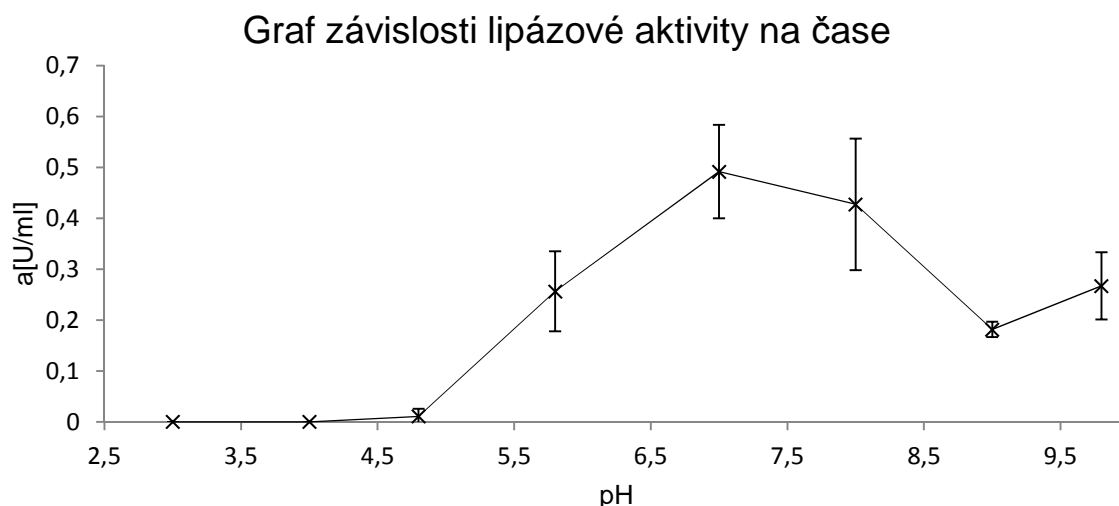
t [min]	A u pH = 3			A u pH = 4			A u pH = 4,8			A u pH = 5,8		
0	0,528	0,49	0,575	0,541	0,549	0,58	0,626	0,666	0,659	0,618	0,608	0,731
1	0,541	0,495	0,576	0,544	0,552	0,586	0,629	0,67	0,654	0,617	0,604	0,731
2	0,539	0,498	0,581	0,548	0,555	0,589	0,628	0,672	0,652	0,615	0,603	0,731
3	0,533	0,505	0,585	0,552	0,557	0,591	0,627	0,672	0,651	0,613	0,602	0,732

t [min]	A u pH = 7			A u pH = 8			A u pH = 9			A u pH = 9,8		
0	0,588	0,590	0,199	0,194	0,220	0,358	0,293	0,264	0,497	0,441	0,475	0,637
1	0,592	0,595	0,200	0,196	0,221	0,360	0,295	0,264	0,489	0,445	0,484	0,643
2	0,600	0,602	0,202	0,198	0,222	0,364	0,298	0,267	0,493	0,447	0,492	0,646
3	0,607	0,610	0,204	0,200	0,226	0,369	0,301	0,270	0,501	0,451	0,494	0,648

Tab. 14-15: Výpočet lipázové aktivity pankreatinu

	pH = 3			pH = 4			pH = 4.8			pH = 5.8			pH = 7		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΔA	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	0,001	0,011	0,008	0,005	0,019	0,015	0,012
U/ml							0,0000	0,0000	0,0321	0,3526	0,2564	0,1603	0,6090	0,4808	0,3846
Průměr							-	0,0107	-	-	0,2564	-	-	0,4915	-
SMODCH							-	0,0151	-	-	0,0785	-	-	0,0919	-

	pH = 8			pH = 9			pH = 9.8		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΔA	0,01	0,019	0,011	0,005	0,006	0,006	0,011	0,008	0,006
U/ml	0,3205	0,6090	0,3526	0,1603	0,1923	0,1923	0,3526	0,2564	0,1923
Průměr	-	0,4274	-	-	0,1816	-	-	0,2671	-
SMODCH	-	0,1291	-	-	0,0151	-	-	0,0659	-



Graf 17: pH profil lipázové aktivity pankreatinu

Lipázová enzymatická aktivita pankreatinu je dle výpočtů a z nich sestrojeného grafu nejvyšší při pH 7. Hodnoty, které vycházely v rozdílu absorbancí záporně, byly počítány jako nulové.

5.5 Stanovení teplotního optima jednotlivých enzymů pankreatinu

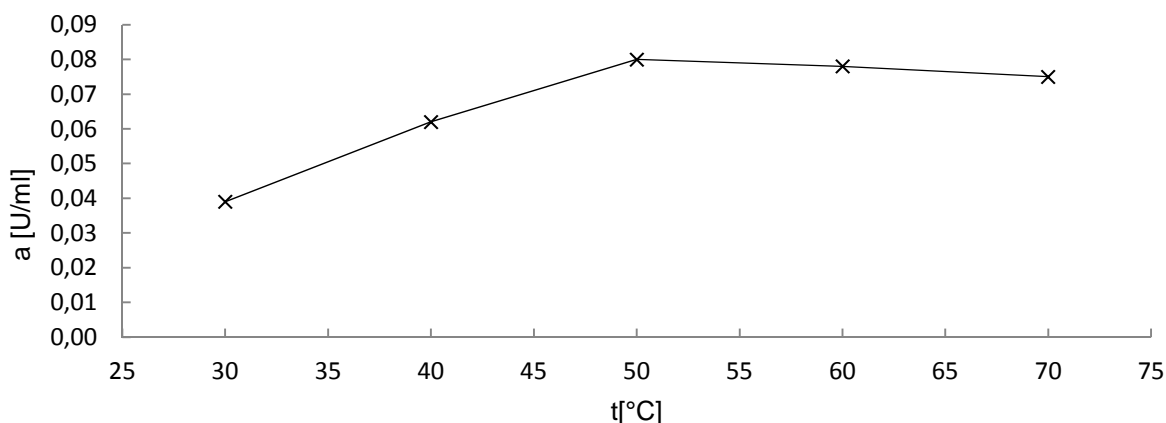
5.5.1 Proteázová aktivita pankreatinu

Byl aplikován stejný postup jako u stanovení teplotní aktivity s různými hodnotami pH s tím rozdílem, že místo rozdílného pH se vzorky temperovaly s různou hodnotou °C od 30 až po 70 °C s krokem 10 °C. Všechny vzorky byly připraveny s pufrům pH = 9,8.

Tab. 16: Naměřená data absorbancí a výpočet enzymových aktivit

[°C]	[-]				[U/ml]
t [°C]	A			Průměr	$\frac{A}{t} \cdot 10$
30	0,178	0,173	-	0,176	0,0390
40	0,285	0,277	-	0,281	0,0620
50	0,366	0,356	-	0,361	0,0800
60	0,355	0,344	0,354	0,351	0,0780
70	0,344	0,341	0,333	0,339	0,0750

Graf závislosti proteázové aktivity na teplotě



Graf 18: Teplotní profil proteázové aktivity pankreatinu

Enzym pankreatin prokazuje nejvyšší proteázovou aktivitu v 50 °C. Klesající tendence enzymové aktivity není tak zřetelná ve vyšších teplotách, lze tedy říci, že má pankreatin téměř konstantní enzymovou aktivitu od 50 °C do 70 °C.

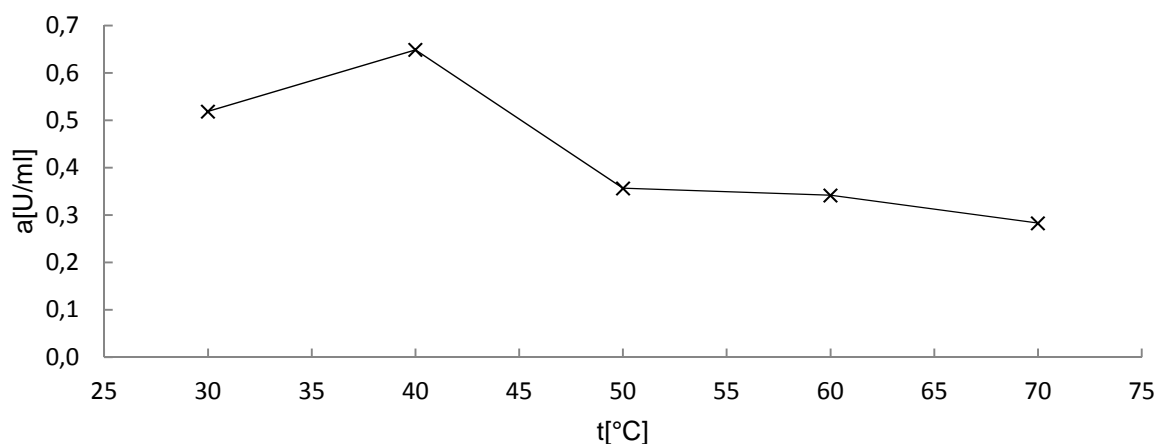
5.5.2 Amylázová aktivita pankreatinu

Teplotní amylázová aktivita pankreatinu byla zjišťována obdobně jako pH profil. Hodnota pH ale bylo v tomto měření konstantní, a to pH 7. Proměnnou složkou byla teplota v rozmezí od 30 – 70 °C.

Tab. 17: Hodnoty teplot a jejich příslušných absorbancí a aktivit

[°C]	[-]					[U/ml]
Teplota:	A	A	A	A	průměr	a
30	0,586	0,629	-	-	0,608	0,5188
40	0,706	0,751	0,789	0,794	0,760	0,6489
50	0,454	0,397	0,426	0,394	0,418	0,3567
60	0,363	0,390	0,416	0,432	0,400	0,3417
70	0,276	0,363	0,308	0,378	0,331	0,2828

Graf závislosti amylázové aktivity na teplotě



Graf 19: Teplotní profil amylázové aktivity pankreatinu

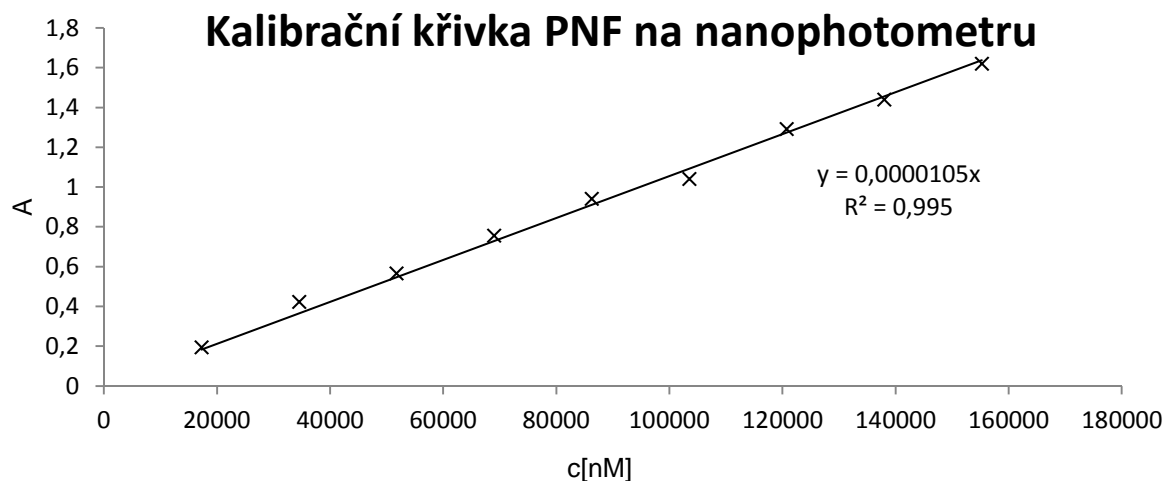
Amylázová aktivita pankreatinu má dle grafu maximum ve 40 °C.

5.5.3 Lipázová aktivita pankreatinu

Lipázová aktivita enzymu byla nejdříve proměřena na přístroji ELISA reader, přístroj ale nedokázal udržet po dobu měření konstantní teplotu, výsledky tedy byly značně zkreslené. K identifikaci lipázové aktivity pankreatinu byl tedy použit nanophotometer. Měření bylo provedeno se vzorky obsahující identický pufr o pH=7 a byly inkubovány při teplotách od 30 – 70 °C po dobu 30 minut. Jelikož se při postupu identifikace lipázové aktivity museli změnit přístroje, bylo nutné na nanophotometru určit kalibrační křivku paranitrofenolu.

Tab. 18: Hodnoty kalibrační křivky PNF

[ml]		[mg/ml]	[µg/ml]	-
V PNF	V pufru	c	c	A
0,1	0,9	0,0024	2,4	0,195
0,2	0,8	0,0048	4,8	0,423
0,3	0,7	0,0072	7,2	0,566
0,4	0,6	0,0096	9,6	0,756
0,5	0,5	0,012	12	0,941
0,6	0,4	0,0144	14,4	1,041
0,7	0,3	0,0168	16,8	1,292
0,8	0,2	0,0192	19,2	1,44
0,9	0,1	0,0216	21,6	1,62

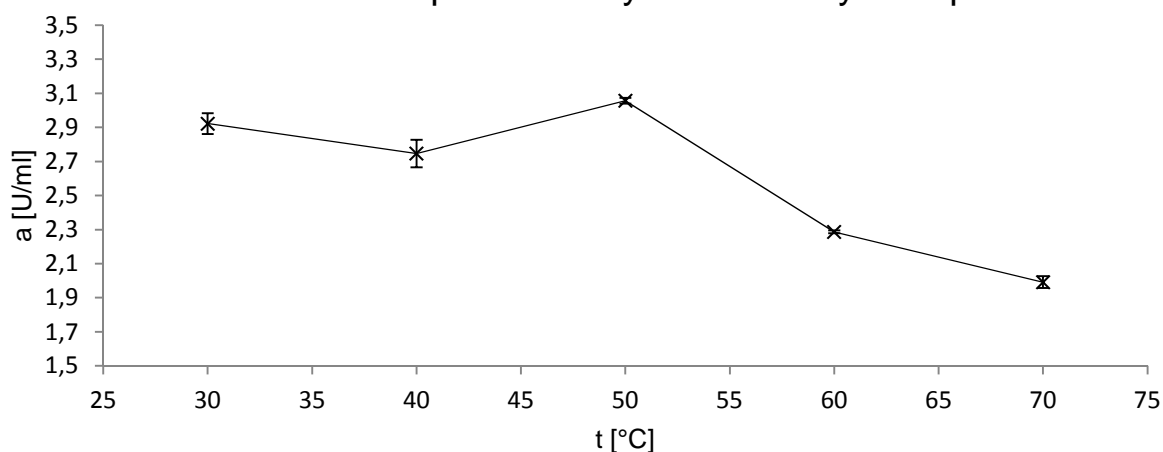


Graf 20: Kalibrační závislost koncentrace PNF na absorbanci při 405 nm

Tab.19: Hodnoty absorbancí pro různé teploty

[°C]	[-]							[U/ml]	[-]
t	A	A	A	A	A	A	průměr	a	SMODCH
30	0,885	0,987	0,84	0,97	-	-	0,921	2,9222	0,0604
40	0,996	0,837	0,814	0,797	0,956	0,791	0,865	2,7466	0,0805
50	0,974	0,929	0,972	0,961	0,982	0,959	0,963	3,0566	0,0170
60	0,73	0,723	0,725	0,703	0,722	0,718	0,720	2,2862	0,0085
70	0,623	0,673	0,637	0,576	-	-	0,627	1,9913	0,0348

Graf závislosti lipázové enzymové aktivity na teplotě



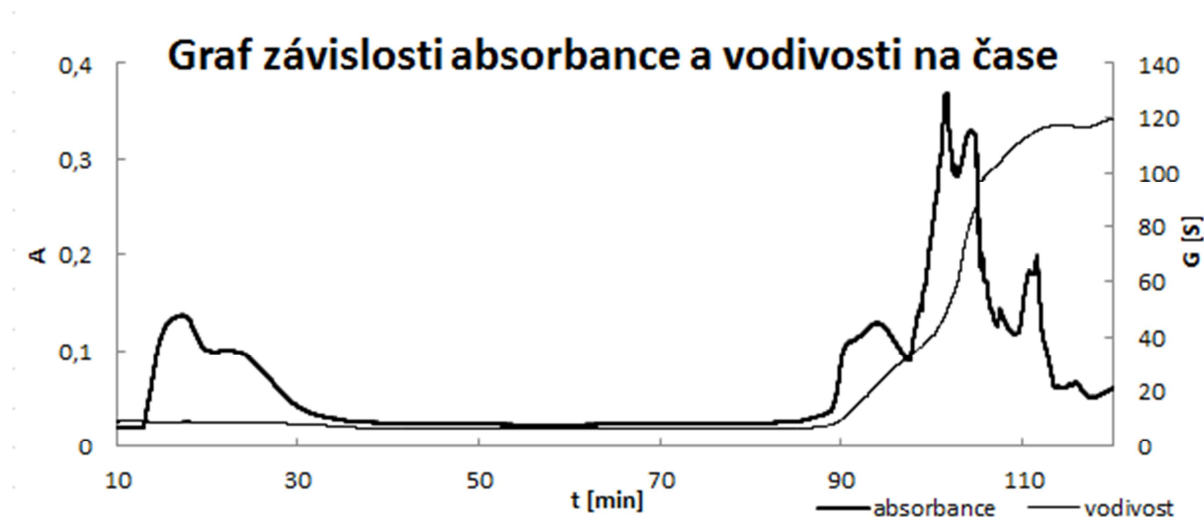
Graf 21: Teplotní profil lipázové aktivity pankreatinu

Z grafu vyplývá, že maximum lipázové aktivity je v 50 °C, optimální hodnoty jsou ale i při teplotách 30 – 50 °C, poté aktivita rapidně klesá.

5.6 Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC

5.6.1 Iontoměničová LPLC

Stanovení pomocí LPLC bylo provedeno s puforem o pH 8,3 a s maximální koncentrací pankreatinu, vymývání vzorku bylo postupně prováděno lineárním gradientem pufru o pH 8,3 a 1 M NaCl. Do zkumavek byly odebírány frakce po 3 ml a v nich stanovena aktivita všech tří složek pankreatinu.



Graf 22: Stanovení pankreatinu pomocí iontoměničové LPLC

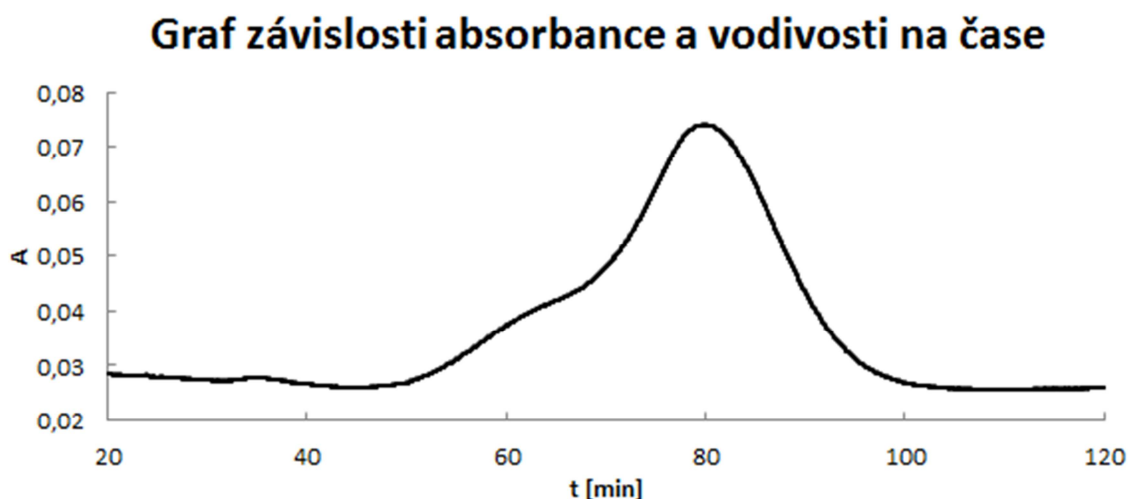
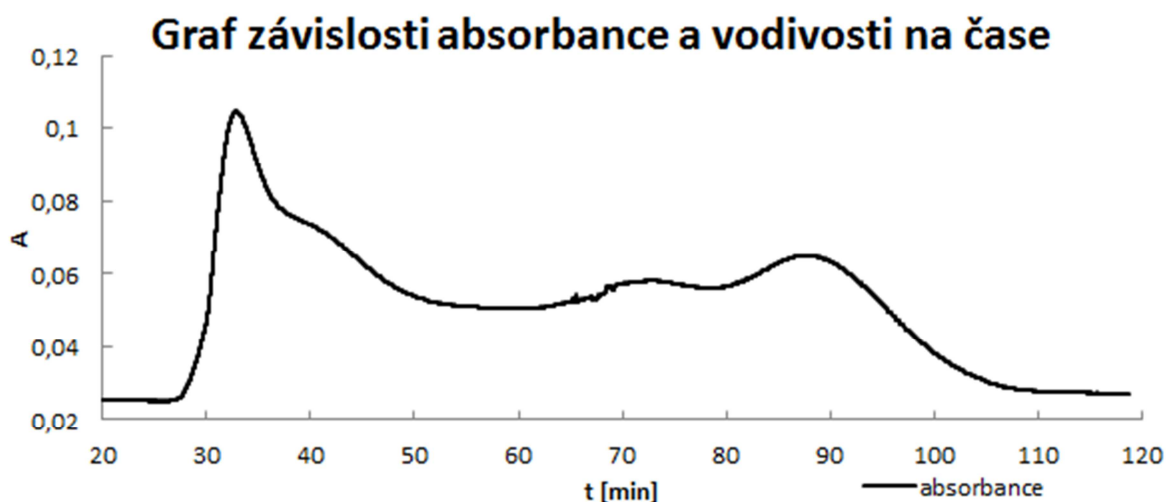
Tab. 20: Data absorbancí a výpočet aktivit pro 3 složky aktivit pankreatinu

Zkumavka [min]	Proteázová aktivita		Amylázová aktivita		Lipázová aktivita	
	A	a [U/ml]	A	a [U/ml]	A	a [U/ml]
odpad	0,178	0,0396	0,154	0,1315	0,007	0,2244
90-96	0,014	0,0031	0,156	0,1332	0,017	0,5449
97-102	0,105	0,0233	0,117	0,0999	0,010	0,3205
103-108	0,199	0,0442	0,096	0,0820	0,021	0,6731
109-115	0,328	0,0729	zákal	-	0,008	0,2564
116-121	0,158	0,0351	zákal	-	0,010	0,3205
122-127	0,055	0,0122	zákal	-	0,007	0,2244

Z analýzy aktivit jednotlivých složek pankreatinu ve frakcích je patrné, že nedošlo k dobré separaci jednotlivých enzymů, např. velká část proteolytických enzymů se na koloně vůbec nezadržovala, podobně tomu bylo i u amyláz. Pro lepší separaci by bylo nezbytné optimalizovat sorpční podmínky (pravděpodobně zvýšit pH pufru) a také optimalizovat podmínky eluce.

5.6.2 Gelová filtrace LPLC

Gelová filtrace byla provedena s puforem taktéž o pH = 8,3. Graf byl porovnán se standardem BIO-RAD 151-1901 s komponenty Thyroglobulin o molekulární hmotnosti 670 kDa, γ -globulin o 158 kDa, ovalbumin o 44 kDa, myoglobin o 17 kDa a vitamin B₁₂ o 1,35 kDa [28].



Z chromatografu standardu lze vyčíst, že se ve 30. minutě vyplavily molekuly o velikosti 670 a 158 kDa, které byly příliš velké a na použitém chromatografickém médiu se neseperoaly, ve 40. minutě se vyplavily molekuly o hmotnosti 44 kDa, poté se postupně vyplavovaly v 70. minutě molekuly o hmotnosti 17 kDa a nakonec v 90. minutě i vitamin B₁₂ o velikosti 1,35 kDa. Vzorek pankreatinu tedy obsahoval minimum molekul o velikosti nad 50 kDa, více molekul bylo o molekulové hmotnosti cca 20 kDa a největší zastoupení molekul je o velikosti cca 2 kDa. Tyto výsledky jsou konzistentní s analýzou velikostí jednotlivých proteinů pankreatinu pomocí PAGE-SDS.

5.7 Enkapsulace do liposomů

Testovány byly enkapsulace pankreatinu (0,5 mg/ml) do liposomů připravených v prostředí obsahující koncentrace lipidických složek. Bylo stanovováno enkapsulované množství enzymu, proteázová aktivita jako marker nativity enzymu, distribuce velikosti částic, zeta potenciál.

5.7.1 Výsledky stanovení množství enkapsulovaného pankreatinu

Vzorek pankreatinu o koncentraci 0,5 mg/ml byl enkapsulován do různých koncentrací (1,25; 5; 10 a 25 mg/ml) lecitinu s cholesterolem v poměru 9:1. Pomocí H-L metody rozdílem absorbancí vzorku před a po enkapsulaci byla zjištěna koncentrace enkapsulovaného množství ve vzorcích. Koncentrace pankreatinu byla vypočtena z kalibrační křivky s regresní přímkou $y=1,613x$.

Tab. 21: Naměřené hodnoty před enkapsulací

[mg/20 ml]	[mg/ml]	[-]	[mg/ml]
c liposomů	c liposomů	A pan.	c pan.
25	1,25	0,376	0,466
100	5	0,376	
200	10	0,376	
500	25	0,376	

Tab. 22: Naměřené hodnoty po enkapsulaci

[mg/20 ml]	[-]	[mg/ml]		[%]
c liposomů	A po enkaps.	c po enkaps.	Δc	Enkaps. účinnost
25	0,373	0,4625	0,0037	0,80
100	0,337	0,4179	0,0484	2,66
200	0,366	0,4538	0,0124	7,7
500	0,13	0,1612	0,3050	65,43

S rostoucí koncentrací liposomů se zvyšuje i enkapsulační účinnost. V nejvyšší koncentraci 25 mg/ml tedy byla naměřena maximální enkapsulační účinnost.

5.7.2 Výsledky stanovení proteázové aktivity enkapsulovaného pankreatinu

Cílem experimentu bylo potvrdit, jestli je možné enkapsulovat naivní protein do struktury liposomu a jestli pak liposomy enkapsulované enzymy spontánně uvolňují. Jako zástupce celkové enzymové aktivity pankreatinu byla vybrána aktivita proteázová. Postup byl identický jako v předchozích případech určování proteázové aktivity. Jako ideální podmínky pro pankreatin bylo zvoleno pH 9,8 a teplota 50 °C.

Liposomy byly rozsuspendovány v pufru o pH 9,8 a inkubovány po dobu 1 hodiny při 50 °C. Poté byly opět stočeny a v supernatantu byla stanovena proteázová aktivita identicky jako v kapitolách 4.5.1 a 4.6.1, pro inkubaci byla zvolena optimální teplota 50 °C. Enzymová aktivita byla ale nulová. Vysvětlení nulové aktivity může být dvojitě. Za prvé mohlo dojít k inaktivaci enzymu denaturací jeho funkční struktury při enkapsulaci ultrazvukem, nebo membrána, ve které je enzym enkapsulován ho zadržuje a zpětně neuvolňuje do okolí.

5.7.2.1 Stanovení proteázové aktivity pomocí fosfolipázy D ze zelí

Jako indikátor nativního stavu enkapsulovaného enzymu byla vybrána proteázová aktivita. Nejprve byla proměřena proteázová aktivita zásobního roztoku před a po vystavení vzorku ultrazvuku. Poté byla stanovena i proteázová aktivita enzymů ze sedimentu, který obsahoval enkapsulované molekuly enzymu uvolněné z liposomů pomocí fosfolipázy D ze zelí i proteolytická aktivita extraktu ze zelí. Tyto dvě hodnoty absorbancí byly od sebe odečteny a výsledné hodnoty porovnány s aktivitou zásobního roztoku pankreatinu.

Tab. 23: Hodnoty absorbancí a enzymových aktivit pankreatinu

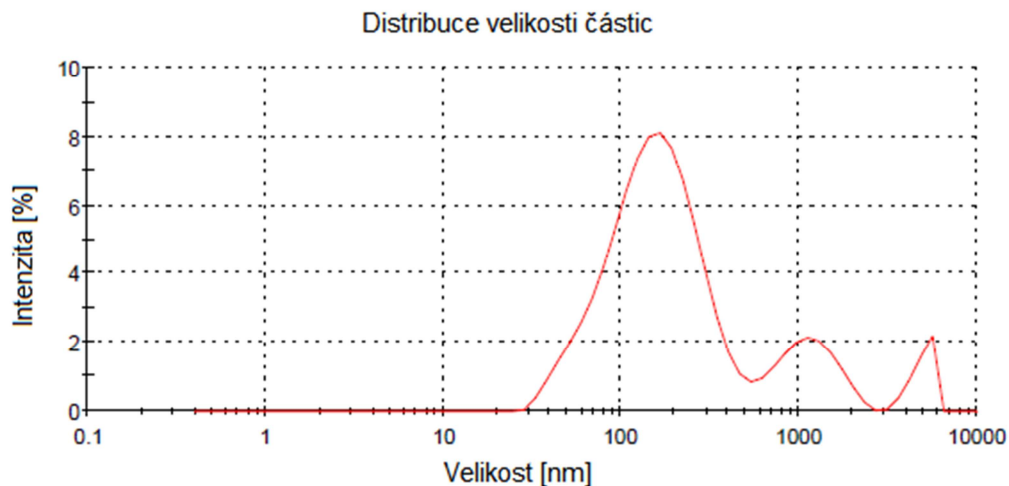
	[-]				[U/t]
	A ₂₈₀	A ₂₈₀	A ₂₈₀	Průměr	aktivita
Před ultrazvukem	0,410	0,486	0,388	0,428	0,071
Po ultrazvuku	0,637	0,600	0,599	0,612	0,102
Extrakt ze zelí.	0,730	0,720	0,735	0,728	0,121
Liposomy vystavené působení extraktu ze zelí	1,008	0,909	0,823	0,913	0,152
Samotný enzym	0,278	0,189	0,088	0,185	0,031

Z výsledků je patrné, že proteázová aktivita pankreatinu se po ultrazvuku zvýšila, enzym se tedy nenedenaturoval, naopak došlo pravděpodobně díky lepší dispergaci enzymu k navýšení jeho aktivity. Aplikace fosfolipázy potvrdila, že do struktury liposomů se podařilo uzavřít nativní enzym, který se uvolnil právě jejím působením. Po odečtení hodnot proteolytické aktivity extraktu ze zelí od liposomů vystaveným působení zelného extraktu je aktivita téměř poloviční jako aktivita pankreatinu před ultrazvukem a třetinová jako po ultrazvuku.

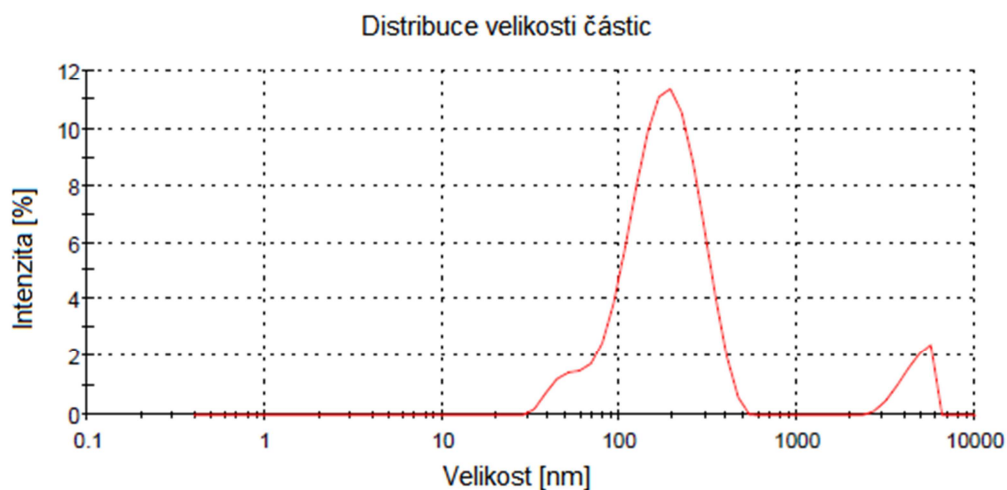
5.7.3 Výsledky stanovení distribuce velikosti částic a jejich zeta potenciál

Výsledky v sobě skýtají dvě měření, kdy u druhého vzorku byla jako další krok v postupu sjednocována velikost částic pod 100 nm.

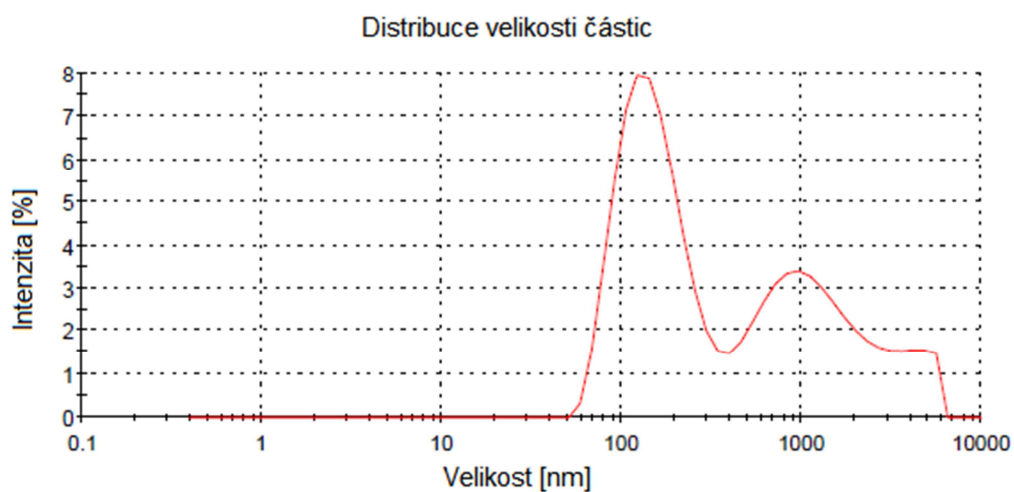
Porovnání výsledků DLS s membránovým extrudérem bez něj.



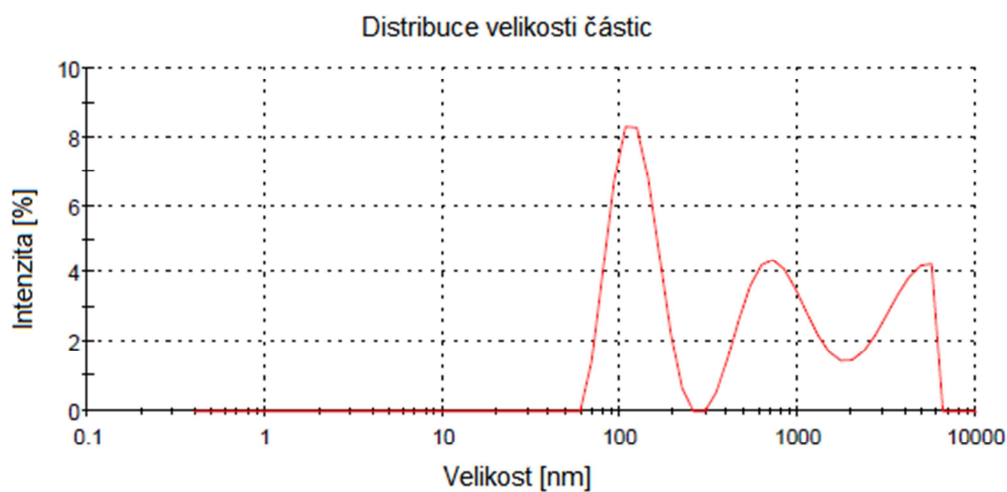
Obr. 13: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml



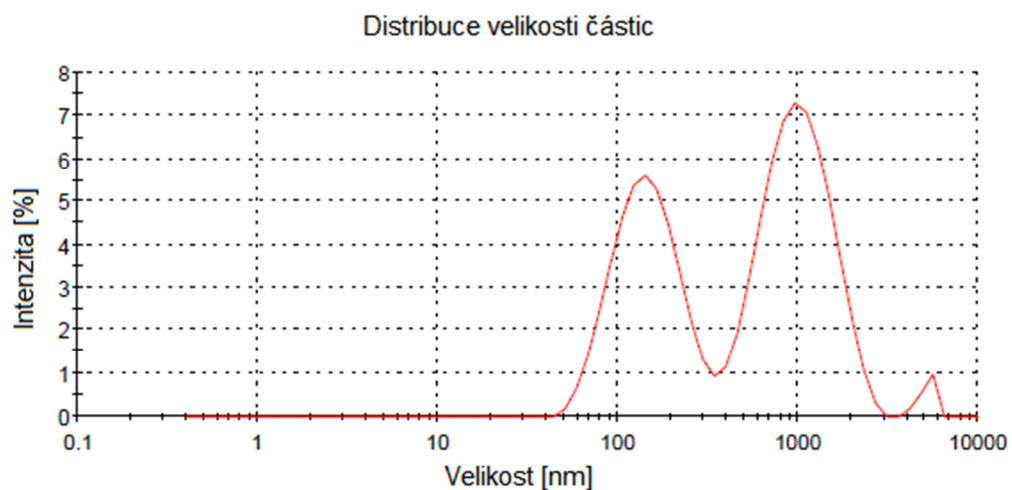
Obr. 14: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



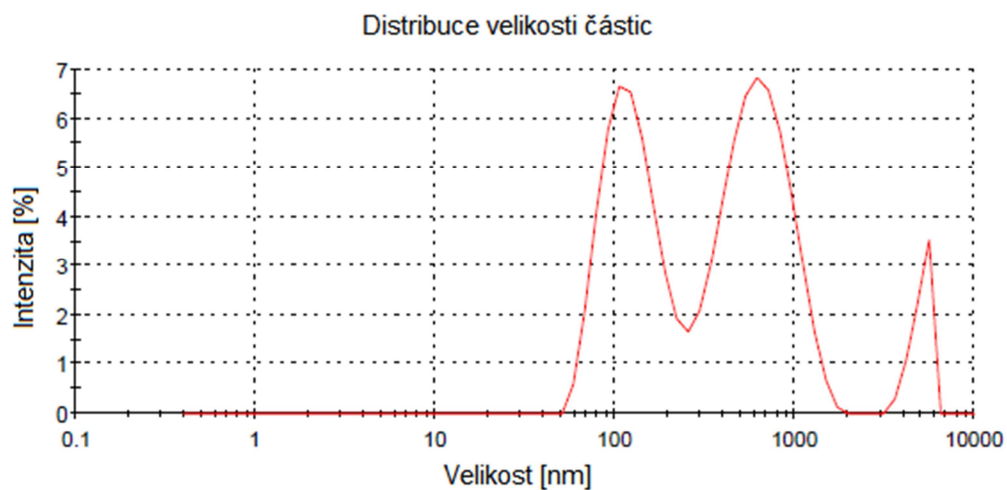
Obr. 15: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml



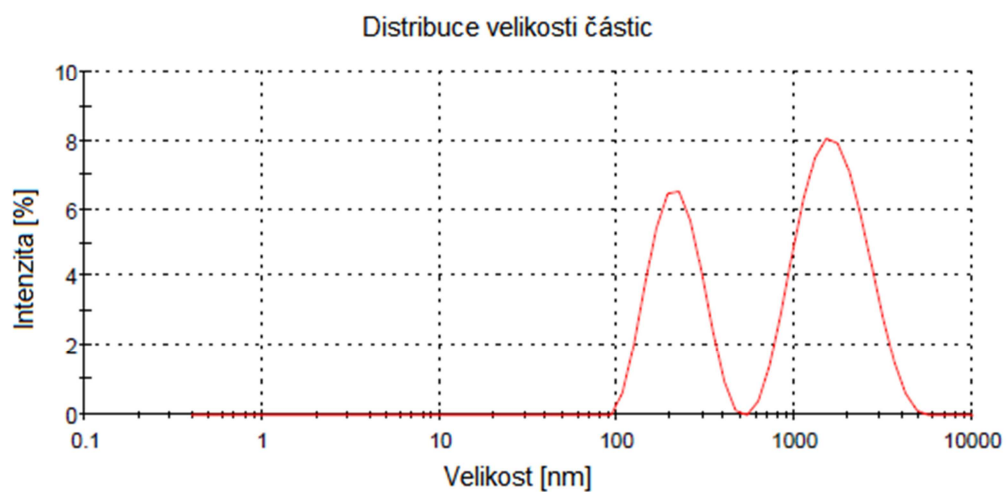
Obr. 16: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



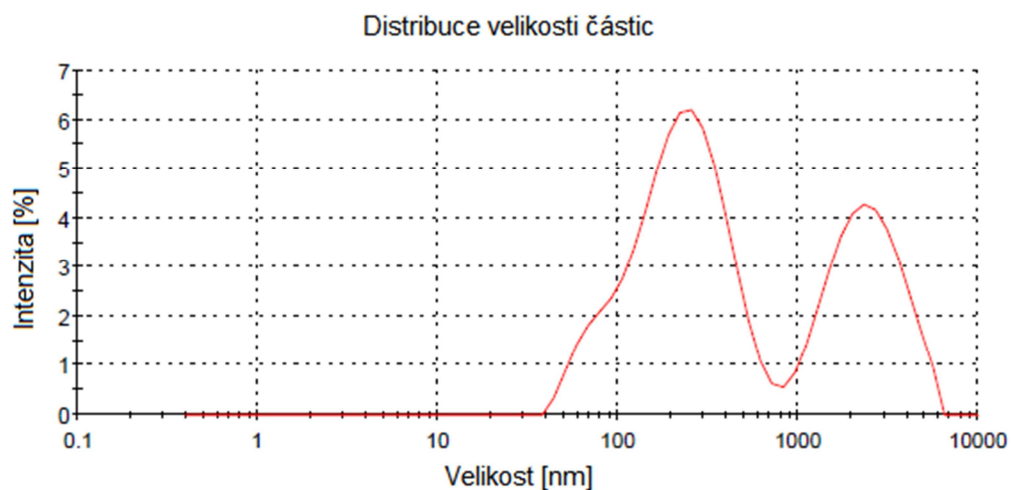
Obr. 17: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml



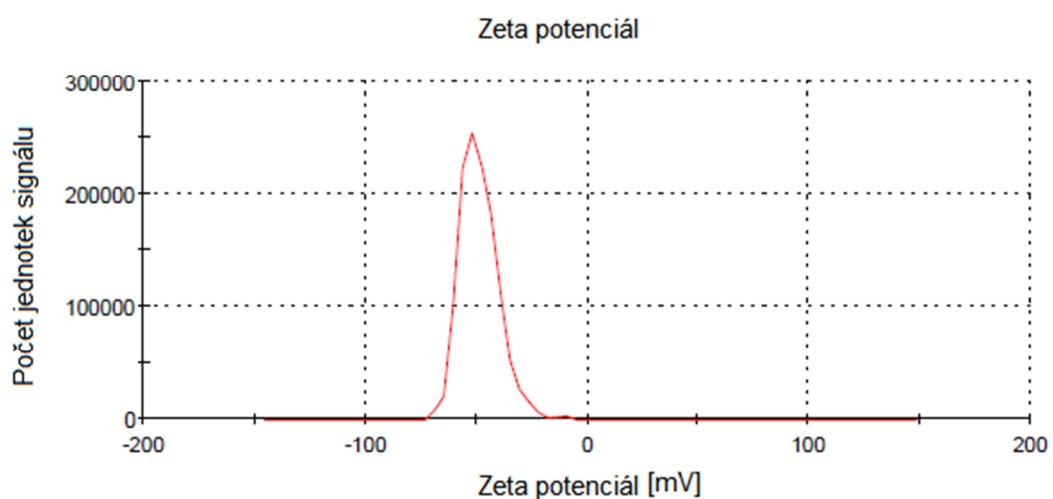
Obr. 18: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



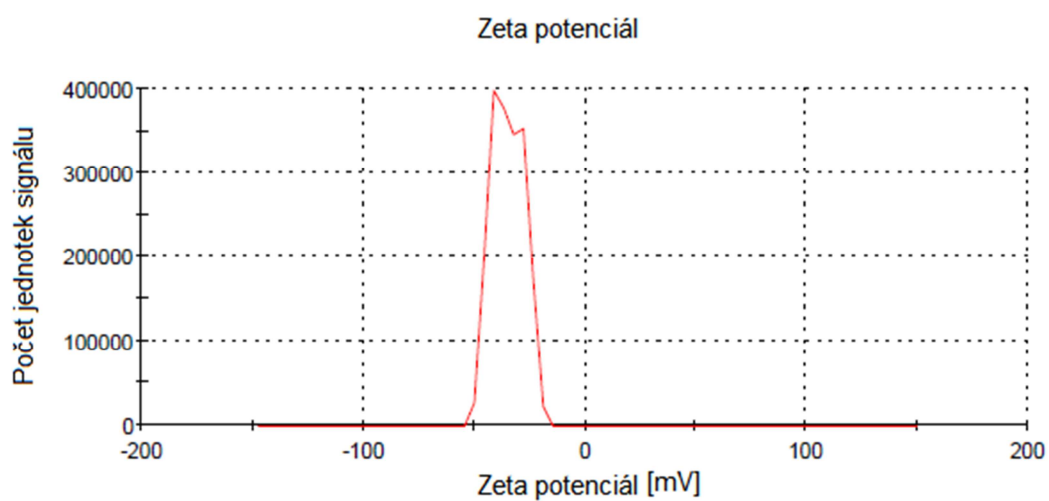
Obr. 19: Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml



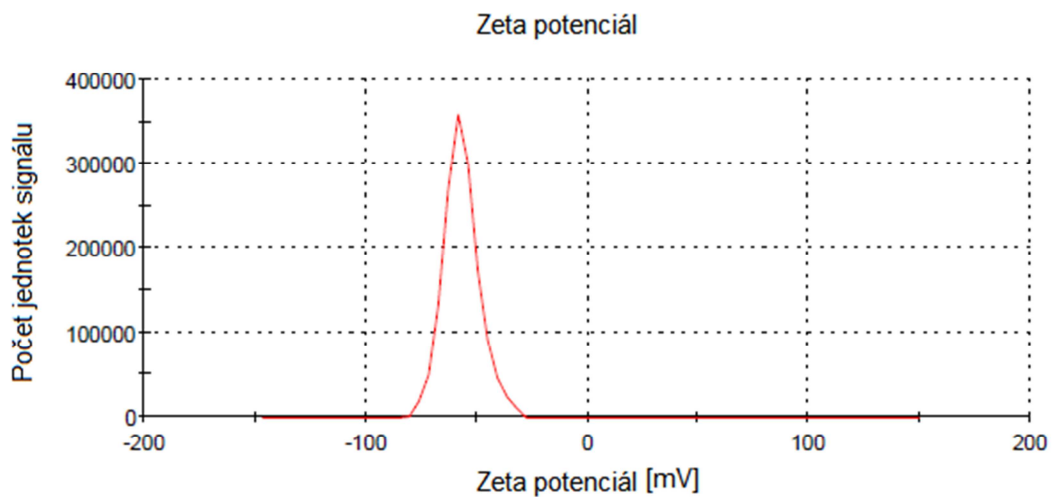
Obr. 20: D Distribuce velikosti částic při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



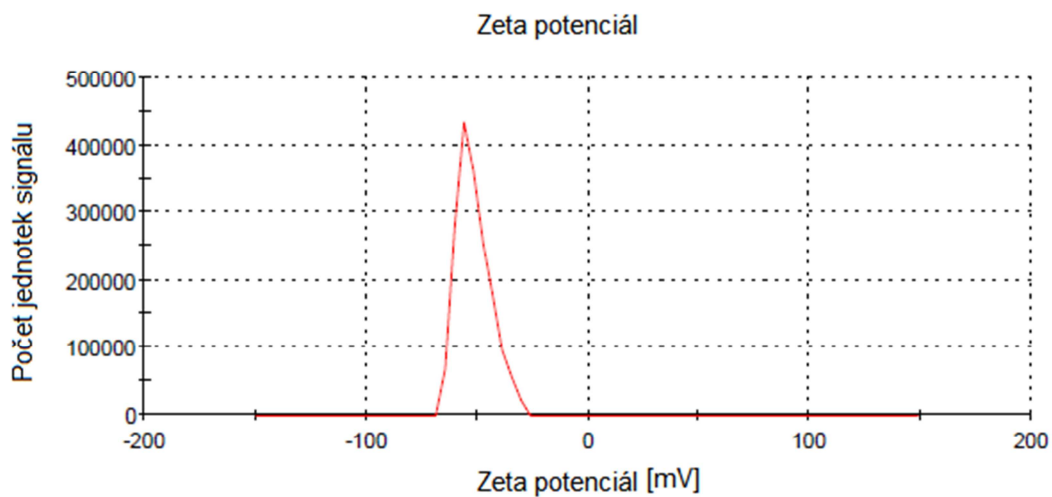
Obr. 21: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml



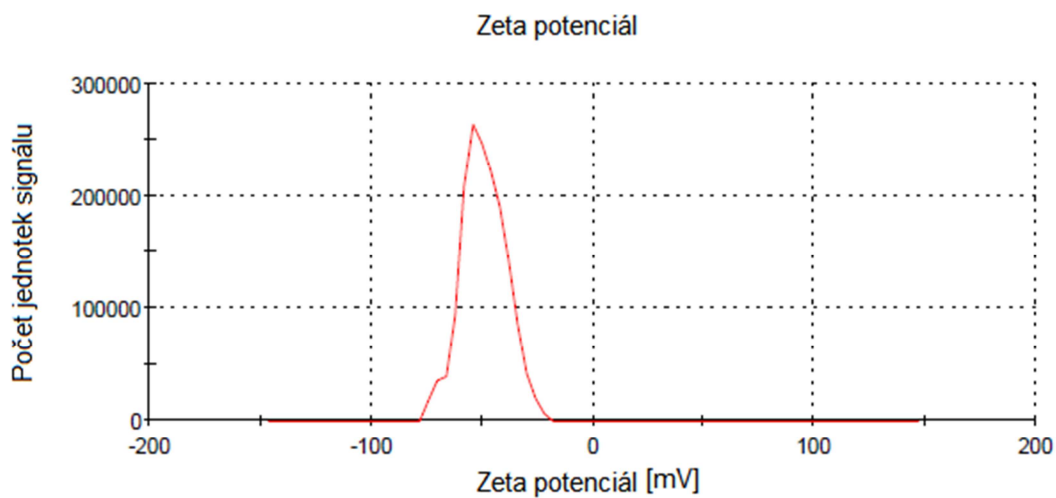
Obr. 22: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 25 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



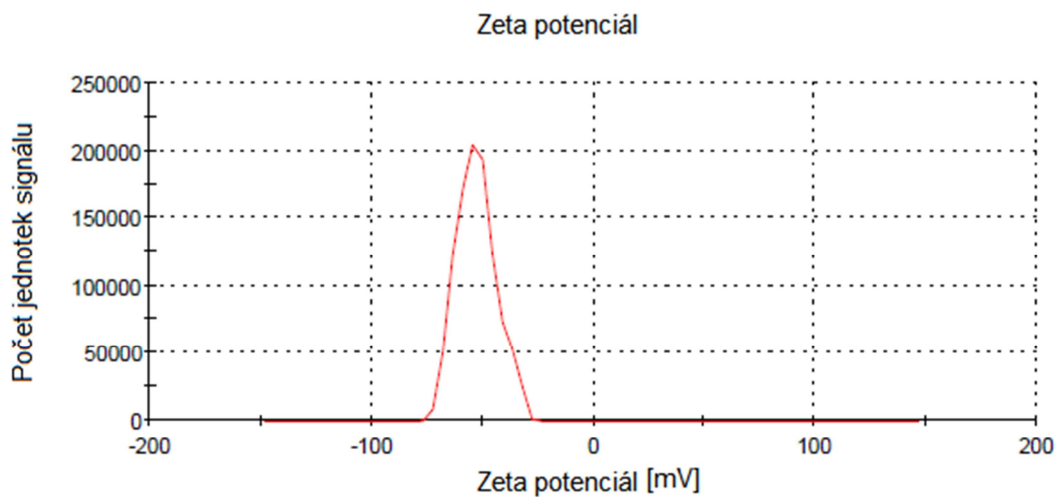
Obr. 23: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml



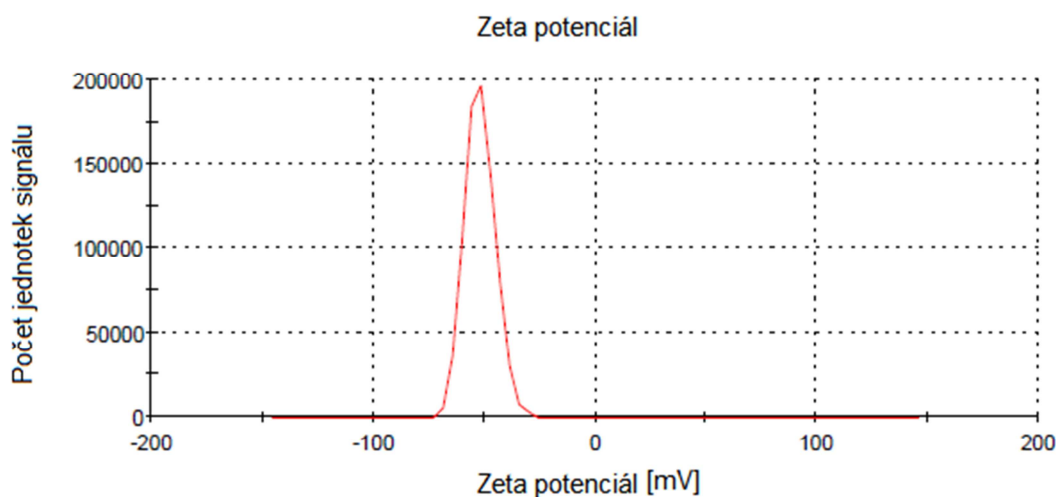
Obr. 24: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 100 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



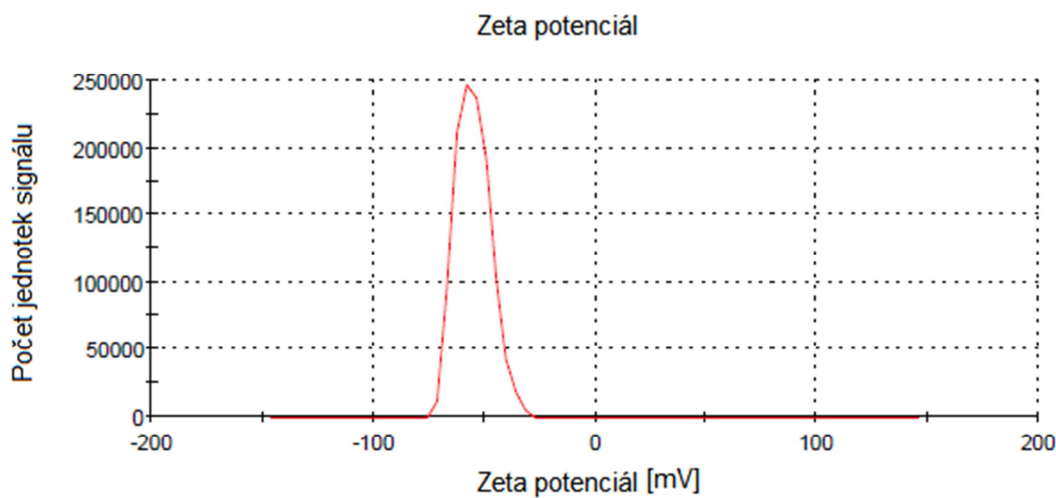
Obr. 25: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml



Obr. 26: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 200 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru



Obr. 27: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml



Obr. 28: Zeta potenciál při koncentraci lecitinu s cholesterolem 500 mg/20 ml s použitím membránového extrudéru

Z grafů pro distribuci velikosti částic lze na první pohled zjistit, že liposomy s enkapsulovaným pankreatinem jsou značně polydisperzní. Tomuto faktu neprospěl ani mezikrok s použitím membránového extrudéru. Rozdíly mezi použitím membránového extrudéru a vzorky bez použití membránového extrudéru jsou až na první koncentraci liposomů minimální, což mohlo být způsobeno např. prasknutím membrány nebo proniknutím vzorku mimo membránu, která sjednocovala velikost liposomů.

Zeta potenciál je téměř u všech vzorků lišícími se pouze odlišnou koncentrací liposomů stejný, a to -50 mV, což znamená, že jsou částice koloidně stabilní a nehrozí koagulace.

6 Závěr

V předložené práci byl studován pankreatin, což je soubor enzymů vylučovaných slinivkou břišní do dvanáctníku, kde štěpí bílkoviny, cukry a tuky z potravy. Práce se zaměřovala na charakterizaci pankreatinu a určení optimálních hodnot pH a teploty pro nejdůležitější enzymatické aktivity pankreatinu, dále na jeho enkapsulaci do liposomů a studium aktivity enkapsulovaných molekul enzymů.

V teoretické části jsou obsaženy obecné informace o enzymech, jejich vlastnosti, mechanismus působení, dále je blíže popsán pankreatin a všechny jeho enzymatické složky, tedy proteázová, amylázová a lipázová, dále také jeho příprava a využití jak v medicíně, tak i v průmyslu. V druhém úseku teoretické části byly blíže vysvětleny hlavní metody používané v bakalářské práci, jako jsou LPLC, elektroforéza a DLS.

Praktická část je rozdělena do tří oddílů. Prvním oddílem je charakterizace pankreatinu jako souboru proteinů, tedy optimalizace metod pro zjištění koncentrace proteinu a zjištění velikosti částí pankreatinu pomocí SDS-PAGE. Druhým oddílem je charakterizace pankreatinu jako souboru enzymů neboli zjišťování optimálních podmínek (pH a teplotu) pro vybrané enzymové aktivity a identifikace částí enzymů a jejich aktivity pomocí LPLC ve dvou formách, iontově výměnná chromatografie a gelová filtrace. Posledním oddílem je enkapsulace pankreatinu do liposomů a studium jejich stability, distribuce velikosti částic a v neposlední řadě také zjišťování aktivity enkapsulovaných enzymů.

Při stanovování koncentrace proteinu byly použity tři různé metody s různými detekčními limity. Nejvyšší detekční limit měla metoda Biuretová, poté H-L a s nejnižším detekčním limitem byla použita metoda dle Bradfordové. Nejlepší výsledky vykazovala metoda H-L, byla tedy proměřena pomocí dvou přístrojů, spektrofotometru a ELISA readeru. U enkapsulační účinnosti byla využita regresní přímka z kalibrační křivky spektrofotometru. Dále bylo proměřeno absorpční spektrum BSA, trypsinu a pankreatinu v UV oblasti. Absorbance albuminu měla maximum ve 230 nm, což odpovídá peptidickým a disulfidickým vazbám a ve 280 nm, což odpovídá aromatickým aminokyselinám. Trypsin má tyto maxima ve 210 nm a také ve 280 nm. Pro pankreatin jsou těmito hodnotami 215 nm a 270 nm.

Pomocí SDS-PAGE byla zjištěna velikost všech částí pankreatinu a tato hodnota se pohybovala v rozmezí od cca 2 kDa po 37 kDa u prvního vzorku pankreatinu, u druhého je patrná i zóna o molekulové hmotnosti do 50 kDa. Trypsin obsažený v pankreatinu má velikost 23 kDa, lipáza z pankreatinu pak okolo 50 kDa, zóna u druhého vzorku pankreatinu tedy náleží pravděpodobně lipáze z pankreatinu. U prvního vzorku tato zóna nelze vidět, což může být způsobeno nízkou koncentrací pankreatinu naneseného na gel.

Enzymatická aktivita byla stanovována pro proteázovou, amylázovou a lipázovou složku pankreatinu pro různé hodnoty teploty a pH. Pro proteázovou aktivitu byly použity dva substráty, azokasein a albumin. Azokasein mění barvu v závislosti na pH, proto enzymatická aktivita byla zatížena chybou způsobenou vyšší absorbancí při vyšších hodnotách pH. Pro amylázovou aktivitu byl použit jako substrát 1% škrob a pro lipázovou aktivitu nitrofenylpalmitát. Maxima pH a teplota měla proteázová aktivita při pH 9,8 a 50 °C, amylázová aktivita byla nejvyšší při pH 7 a teplotě 40 °C a lipázová aktivita měla optimum při pH 7 a teplotě také 50 °C.

Stanovení složek pankreatinu pomocí LPLC bylo určováno ve dvou obměnách, iontoměničová a gelová filtrace. Gelová filtrace ukázala, že nejvíce jsou zastoupeny

molekuly o velikosti cca 2 kDa, byly zastoupeny ale i molekuly větší, o 20 kDa, ale i okolo 50 kDa, tyto výsledky potvrzuje i SDS-PAGE.

Enkapsulace do liposomů byla provedena metodou přímého působení ultrazvuku na směs fosfolipidů a cholesterolu, kdy byly použity rozdílné koncentrace lipidů, a to v rozmezí od 1,25 do 25 mg/ml. Pro stanovení množství enkapsulovaných proteinů byla použita metoda H-L a jako zástupce enzymových aktivit byla vybrána aktivita proteázová. Enkapsulační účinnost se zvyšovala se stoupající koncentrací lipidických složek, při nižších koncentracích byla účinnost malá (od 1-8 %), při použití nejvyšší koncentrace lipidů byla účinnost enormně vyšší, 65 %.

Při zjišťování aktivity enkapsulovaného pankreatinu byla nejdříve změřena aktivita vzorku bez jakékoli úpravy. Tato hodnota aktivity byla nulová, liposomy tedy buď samovolně enzymy neuvolňovaly, nebo vystavení enzymu ultrazvuku je denaturuje. Proto byla tedy studována aktivita enzymu po vystavení ultrazvuku. Enzymová aktivita se z hodnoty bez ultrazvuku ($a=0,071$ U/ml) zvýšila po vystavení vzorku ultrazvuku na $0,102$ U/ml. Je tedy patrné, že ultrazvuk enzymy nedenaturuje, naopak lépe je rozpustí v rozpouštědle a vykazují pak vyšší enzymatickou aktivitu. Pro uvolnění enzymů z liposomů byla použita fosfolipáza D ze zelí, která enzymaticky štěpí fosfolipidovou dvojvrstvu. Po rozsuspendování liposomů v extraktu ze zelí, který obsahuje fosfolipázu D a odečtení proteolytické aktivity samotného zelného extraktu byla jasně patrné, že došlo k narušení fosfolipidové membrány a uvolnění nativních enzymů ze struktury liposomů. Lze tedy konstatovat, že příprava liposomů přímou aplikací ultrazvuku je cestou k efektivní enkapsulaci nativního enzymu.

Jako poslední metoda byl použit přístroj DLS, který měří distribuci velikosti částic a jejich zeta potenciál. Pomocí přístroje DLS byly proměřeny všechny formulace liposomů s enkapsulovanými enzymy a jako porovnání k nim ty samé s použitím membránového extrudéru. Velikost částic je i při použití membránového extrudéru značně nerovnoměrná, od desítek po tisíce nm. Zeta potenciál se pohybuje přibližně okolo hodnoty -50 mV bez ohledu na formulaci liposomů, systém je tedy stabilní, částice nebudou za daných podmínek koagulovat.

7 Seznam použitých zkratk

Rf	Retenční faktor
Mr	Molekulová hmotnost
LPLC	Nízkoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Liquid chromatography, kapalinová chromatografie
GC	Gas chromatography, plynová chromatografie
PC	Paper chromatography, papírová chromatografie
TLC	Thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie
IEC	Exchange chromatography, iontově výměnná chromatografie
GPC	Gel permeation chromatography, gelová permeační chromatografie
SEC	Size exclusion chromatography, gelová filtrace
BSA	Hovězí sérovýalbumin
H-L	Hartree-Lowry
PNF	Paranitrofenol
DLS	Zeta sizer nanoseries, dynamický rozptyl světla
SDS-PAGE	Elektroforéza na polyakralamidovém gelu s použitím dodecylsírany sodného
ELISA reader	Enzyme-linked immunosorbent assai reader

8 Literatura

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0600-1
- [2] SOFROVÁ, Danuše. *Biochemie: základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 241 s. ISBN 80-718-4936-7
- [3] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2. přeprac. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2005, 144 s. ISBN 80-863-6911-0
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4
- [5] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9
- [6] *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody: pro studenty středních škol*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1998, 161 s. ISBN 80-718-3083-6
- [7] HAWLEY, Gessner Goodrich a Richard J LEWIS. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 15th ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2007, 1379 s. ISBN 978-047-1768-654
- [8] VÝZKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁŘSKÝ PRAHA. *Využití kafilerních materiálů k výrobě biopreparátů a hydrolysátů*. Praha, 2003.
- [9] ALCON LABORATORIES, Inc. *Use of pluronic surfactant to enhance the cleaning effect of pancreatin on contact lenses* [patent]. USA. United States Patent, US005672575A. Uděleno 30.9.1997. Zapsáno 29. 4.1994
- [10] EWALD, Nils, Reinhard G BRETZEL, Ivan G FANTUS, Manfred HOLLENHORST, Hans U KLOER a Philip D HARDT. Pancreatin therapy in patients with insulin-treated diabetes mellitus and exocrine pancreatic insufficiency according to low fecal elastase 1 concentrations. Results of a prospective multi-centre trial. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2007, roč. 23, č. 5, s. 386-391. ISSN 15207552. DOI: 10.1002/dmrr.708. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.708>
- [11] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMIL. *Bioanalytické metody*. Praha, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [12] MÁROVÁ, Ivana. *Praktikum z biochemie*. 2. vyd. Brno: VUTIUM
- [13] Chromatografické metody. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V HRADCI KRÁLOVÉ. *Ústav lékařské biochemie: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové* [online]. Hradec Králové, © Lékařská fakulta UK 2007 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/dokumenty/Seminare/seminářChromatografické>
- [14] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2
- [15] MATHIOWITZ, Edith. *Encyclopedia of controlled drug delivery*. New York: John Wiley, c1999, 21057 s. ISBN 04711666342
- [16] WANG, Binghe, Teruna SIAHAAN a Richard SOLTERO. *Drug delivery: principles and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2005, 448 s. ISBN 04-714-7489-4
- [17] Technology: Dynamic Light Scattering. MALVERN. *Malvern* [online]. © Copyright 2012 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/labeng/technology/technology.htm>

- [18] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. 2004
- [19] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3
- [20] Zeta potenciál zeta. *Krystalografická společnost. Czech and Slovak Crystallographic Association CSCA* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [21] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. *Mini-PROTEAN 3 Cell: Instruction Manual*. Bio-rad Office. Dostupné z: www.bio-rad.com
- [22] PALA, Martin. *Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 44 s. Bakalářská práce. VUT v Brně
- [23] Buffers. In: [online]. Dostupné z: Buffers. COLLEGE OF NATURAL RESOURCES UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Berkley. *Biological imaging facility* [online]. 1999 [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html>
- [24] Aminokyseliny. MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *Masarykova univerzita* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/03-Aminokys/03-AK2bez.htm
- [25] Biochemie-základy. *Laboratorní průvodce* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: http://www.labo.cz/mft/biochemie_zaklady.htm
- [26] Preparation of pH buffer solution. *Analytical chemistry Resources* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html>
- [27] PINSIRODOM, Praphan a Kirk L. PARKIN. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Lipas assays*. John Wiley and Sons, Inc., 2003. ISBN 978-047-1142-911
- [28] BIO-RAD. *Gel filtration standard: Instruction manual catalog 151-1901*. California: Bio-Rad Laboratories, Inc., 2000
- [29] SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc. *Pancreatic Lipase (1.BB.985): sc-71840*. Dostupné z: <http://datasheets.scbt.com/sc-71840.pdf>
- [30] SYDPATH. *Lipase*. 1999. Dostupné z: <http://www.syddpath.stvincents.com.au/tests/Lipase.htm>